

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Avaliação da exposição ambiental a metais em populações não ocupacionalmente exposta

Madalena Isabel Melo Cota

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Professora Ana Paula Marreilha dos Santos
Professora Maria Teresa Rebelo

I. AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, e aos docentes que me acompanharam no meu primeiro ano deste mestrado, transmitindo-me novos conhecimentos e abrindo os meus horizontes. Agradeço de igual forma à Faculdade de Farmácia, Universidade de Lisboa, que me permitiu desenvolver toda a parte experimental nos Laboratórios de Toxicologia e Métodos Instrumentais de Análise, para a realização desta dissertação.

O meu sincero e profundo obrigado à professora Ana Paula Marreilha dos Santos por toda a sua paciência e disponibilidade. A sua orientação e conselhos foram fundamentais para a realização de todo este trabalho.

Agradeço de igual forma à Vanda, por todos os ensinamentos transmitidos, por todas as horas passadas no laboratório e à sua boa disposição, que ajudava a aliviar o ambiente, mesmo quando nada parecia correr bem

À professora Teresa Rebelo por toda a sua preocupação e disponibilidade, do mesmo modo à professora Maria Luísa Mateus o meu obrigado por estar sempre disposta a ajudar. Não esquecendo a professora Deodália Dias que sempre se mostrou disponível para esclarecer qualquer dúvida e resolução de problemas.

Um agradecimento às professoras da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa as Professora Leonor Correia e à Professora Cristina Marques, assim como à Dra Elisa Micaelo pelo fornecimento das amostras biológicas. Assim como a todos os funcionários do laboratório de análises Noronha, em especial ao Dr. Ricardo Homem de Noronha por ter aceite colaborar neste trabalho.

O meu obrigado à Ana e à Inês por todas as conversas, conselhos, gargalhadas e todos os momentos bem passados que tornavam os dias mais leves e felizes. Aos meus colegas de casa, e a toda família do coração: Isa, a irmã que Lisboa deu-me; Raquel, a minha polícia de estudo preferida; André, Cristina, Verónica, Paixão, Andreia e Nuno, que acompanharam de perto todo o processo. Obrigada pelo vosso apoio, motivação, tempo de escuta, hospitalidade e também os sermões que me deram quando foi necessário. Obrigada por todos os bons momentos que passamos juntos, que tantas vezes me fizeram sentir em casa!

À Zita e à Ju que mesmo estando longe, sempre fizeram sentir-se perto, obrigada pelas intermináveis chamadas telefónicas que por vezes salvavam o dia, pelos puxões de orelhas, por vezes necessários, que serviam de motivação. Obrigada!

Daniela tens a minha eterna gratidão por estares ao meu lado ao longo destes dois anos, começamos como meras colegas, mas termino este ciclo com uma amizade para a vida. Obrigada por tudo, foi muito bom poder partilhar contigo estes dois anos, sabes que foste muito mais que uma colega de trabalho. Se as paredes do laboratório falassem - para além de dizerem que cantamos mal - também contariam que lá muito se trabalhou, riu, desesperou, desabafou e acabariam por concordar que formamos uma dupla imbatível! Obrigada por tudo, do fundo do meu coração!

Por fim, mas não menos importante, à minha família que sempre me apoiou e esteve sempre comigo, mesmo quando parecia que não terminava. Com um obrigado muito especial à minha mãe, que apesar de estar longe vive as minhas vitórias e derrotas, apoiando-me à sua maneira e quer sempre o meu melhor. Só posso esperar que se sinta orgulhosa pelo terminar de mais uma etapa. Grata por tudo, desculpa as dores de cabeça e os cabelos brancos!

II. RESUMO

A qualidade do meio ambiente é fundamental para o nosso bem-estar. Uma maior prevalência de doenças não contagiosas e crónicas têm sido observadas e em parte atribuídas à exposição a substâncias tóxicas, e aos estilos de vida não saudáveis. Relativamente aos contaminantes ambientais, foram estabelecidos quatro grandes grupos, tendo em conta os seus efeitos negativos na saúde. Um destes grupos são o das substâncias químicas inorgânicas, onde se incluem alguns metais pesados.

No grupo dos metais, temos aqueles que são vitais para a saúde humana, em quantidades definidas, enquanto os metalóides e a maioria dos metais pesados não desempenham qualquer função fisiológica nos humanos, podendo causar intoxicações. Os metais pesados são elementos naturais encontrados em toda a crosta terrestre, sendo caracterizados pelo seu elevado peso atómico. Os metais pesados são elementos ubíquos na natureza, estando assim o ser humano exposto por diversas vias, tais como a via oral, inalação e absorção dérmica. Esta exposição diária a um ambiente poluído pode causar acumulação de alguns metais pesados no organismo provocando danos em determinados órgãos ou sistemas. Assim, o nosso principal objectivo foi avaliar a exposição ambiental a três metais (chumbo, manganês e arsénio) em populações não ocupacionalmente expostas em diferentes zonas urbanas de Portugal, através da determinação de biomarcadores no sangue e urina nessas populações.

Para este trabalho, a selecção destes três metais foi feita tendo em conta que estes três metais podem apresentar efeitos neurotóxicos, bem como alterações ao nível da síntese do heme. Para avaliação da exposição foram escolhidos biomarcadores de exposição, como a quantificação dos metais no sangue e na urina, bem como biomarcadores de exposição/efeito, tais como a quantificação do ácido delta-aminolevulínico e das porfirinas na urina, e a actividade da acetilcolinesterase no sangue.

Ao analisarmos os resultados obtidos verificou-se que a concentração dos biomarcadores está relacionada com o meio envolvente. Na zona urbana mais industrializada (Vx), destaca-se os níveis de Pb, já no caso da área urbana com elevado tráfego automóvel e aéreo (Lx) podemos destacar os níveis de Mn e As, onde se verificaram os níveis médios mais elevados. Quanto aos biomarcadores de exposição/efeito observou-se que estas duas mesmas populações foram também as que apresentaram as concentrações médias superiores. No caso das porfirinas as populações Vx e Lx apresentaram valores acima dos estabelecidos, o que poderá indicar uma possível alteração do perfil das porfirinas. No caso do ácido delta-aminolevulínico, novamente Vx e Lx, foram as que apresentaram os níveis médios mais elevados, não ultrapassando no entanto os limites estabelecidos. Quanto à actividade da acetilcolinesterase não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as populações Vx e Lx.

Podemos concluir através dos nossos resultados, que os biomarcadores seleccionados podem reflectir o nível de exposição ambiental aos três metais em estudo nas zonas frequentadas e áreas de habitação das populações analisadas. Verificou-se ainda a dificuldade de se encontrar valores referência para estes metais em fluidos biológicos em populações não expostas ocupacionalmente.

PALAVRAS-CHAVE: Exposição ambiental; Chumbo, arsénio e manganês; Biomarcadores de exposição; Porfirinas e ácido delta-aminolevulínico na urina.

III. ABSTRACT

The quality of the environment is fundamental to our well-being. A higher prevalence of non-contagious and chronic diseases has been ascertained and are attributed in part to toxic substances exposure and unhealthy lifestyles. Concerning environmental contaminants, four large groups were established taking into account their negative effects on health. One of these groups are the inorganic chemicals, which include some heavy metals.

In the metal group, there are metals that are vital for human health in defined amounts, others such as metalloids and most heavy metals have no physiological function in humans and may cause intoxication. Heavy metals are natural elements found throughout the earth's crust and are characterized by their high atomic weight. They are ubiquitous in nature and thus humans are exposed to them by various routes such as ingestion, inhalation and dermal absorption. This daily exposure to a polluted environment can cause accumulation of heavy metals in the body causing damage to certain organs or systems. Thus, our main objective was to evaluate human exposure to three metals, lead, arsenic and manganese in non-occupationally exposed populations in different urban areas of Portugal. The selection of the referred metals was made taking into account their existence in polluted environment and their effects on the nervous system as well as on heme biosynthetic pathways. To obtain the information concerning human metal exposure, exposure biomarkers were chosen, such as the quantification of metals in blood and urine, and also exposure/effect biomarkers, along with the levels of delta-aminolevulinic acid, porphyrins in urine and acetylcholinesterase activity in blood.

When analysing the obtained results, it was verified that the quantification of the biomarkers was related to the surrounding environment. In the most industrialized urban area (Vx), the Pb levels stand out, and in the case of the urban area with high car and air traffic (Lx), Mn and As levels also presented the highest average levels. Regarding effect biomarkers, it was also observed that these two populations were the ones with the highest mean concentrations. In the case of porphyrins, Vx and Lx populations presented values above those established, eventually admitting that the porphyrins profiles could be altered. In the case of delta-aminolevulinic acid, again Vx and Lx, were those that presented higher average levels, but not exceeding the established limits. Regarding the activity of acetylcholinesterase, no significant differences ($p < 0.05$) between Vx and Lx were observed.

Finally, our results showed that the selected biomarkers could reflect the expected environmental exposure to the metals under study, the quality of the frequented areas and the housing areas of the selected populations.

KEY WORDS: Environmental exposure; Lead, arsenic and manganese; Exposure biomarkers; Porphyrins and delta-aminolevulinic acid in urine;

IV. ÍNDICE

I.	AGRADECIMENTOS	I
II.	RESUMO	II
III.	ABSTRACT	III
IV.	ÍNDICE	IV
	LISTA DE TABELAS E FIGURAS	VI
	LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
	CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO	1
1.1	O meio ambiente e o bem-estar	1
1.1.1	Contaminação do ambiente por metais.....	1
1.2.	Chumbo	2
1.2.1	Considerações gerais	2
1.2.2	Aplicações	3
1.2.3	Fontes e vias de exposição	3
1.2.4	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção	4
1.2.5	Efeitos tóxicos	4
1.2.6	Mecanismos de toxicidade	5
1.2.7	Estudos epidemiológicos	6
1.3.	Manganês	8
1.3.1	Considerações gerais	8
1.3.2	Manganês: elemento essencial	8
1.3.3	Aplicações	9
1.3.4	Fontes e vias de exposição	9
1.3.5	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção;	9
1.3.6	Efeitos tóxicos	10
1.3.7	Mecanismos de toxicidade	11
1.3.8	Estudos epidemiológicos	12
1.4.	Arsénio	13
1.4.1	Considerações gerais	13
1.4.2	Aplicações	14
1.4.3	Fontes e vias de exposição	14
1.4.4	Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção	14
1.4.5	Efeitos tóxicos	15
1.4.6	Mecanismos de toxicidade	16
1.4.7	Estudos epidemiológicos	17

1.5. Biomarcadores.....	18
1.5.1 Biomarcadores de exposição	18
1.5.2 Biomarcadores de efeito.....	19
CAPÍTULO 2 – OBJECTIVOS	22
CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1 Material	23
3.1.1 Amostras - caracterização.....	23
3.1.2 Reagentes.....	23
3.1.3 Descontaminação do material.....	24
3.2 Métodos de análise	24
3.2.1 Quantificação de metais no sangue e urina por espectrofotometria de absorção atómica....	24
3.2.2 Quantificação dos biomarcadores de efeito.....	27
3.3 Tratamento estatístico.....	30
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS	31
4.1 Determinação de biomarcadores em amostras de urina e sangue	31
4.1.1 Determinação do Pb, Mn e As em amostras de urina no grupo A	31
4.1.2 Determinação de Pb, Mn e As em amostras de sangue no grupo A.....	32
4.1.3 Determinação das Porfirinas e Ácido delta- aminolevulínico na urina e Acetilcolinesterase no sangue no grupo A.....	33
4.1.4 Determinação do Pb, Mn e As em amostras de urina no grupo B.....	34
4.1.5 Determinação do Pb, Mn e As em amostras de sangue no grupo B.....	35
4.1.6 Determinação das Porfirinas e Ácido delta- aminolevulínico na urina e Acetilcolinesterase no sangue no grupo B.....	36
4.2 Análise discriminante	36
CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO.....	39
CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Tabela 3.1 - Parâmetros de validação estimados para os métodos de determinação de metais.

Tabela 4.1 - A tabela representa a percentagem dos indivíduos (N=89,8%) que, após análise discriminante, foram agrupados correctamente nas populações Ax, Sx, Lx e Vx, através dos níveis de biomarcadores determinados na urina (Pb-U, As-U, porfirinas e ALA).

Tabela 4.2 - A tabela representa a percentagem dos indivíduos (N=88,0%) que, após análise discriminante, foram agrupados correctamente nas populações Ax, Sx, Lx e Vx, através dos níveis de biomarcadores de efeito na urina (porfirinas e ALA).

Figura 1.1 – Esquema da biossíntese do grupo heme.

Figura 4.1 - Níveis de Pb na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em amostras de populações Ax, Sx, Lx e Vx. N = 16, 7, 25 e 23, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: * e ^ são $p < 0,05$ vs Ax e Sx.

Figura 4.2 - Níveis de Mn na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em amostras de populações Ax, Sx, Lx e Vx. N = 16, 7, 26 e 23, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: *, ^ e # são $p < 0,05$ vs Ax, Sx e Lx.

Figura 4.3 - Níveis de As na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em amostras de populações Ax, Sx, Lx e Vx. N = 16, 7, 26 e 24, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: *, ^ e # são $p < 0,05$ vs Ax, Sx e Lx.

Figura 4.4 - Níveis de Pb no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 31 e 28, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

Figura 4.5 - Níveis de Mn no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 32 e 24, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

Figura 4.6 - Níveis de As no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 30 e 28, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

Figura 4.7 - Níveis de porfirinas na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Ax, Sx, Lx e Vx. N = 13, 6, 24 e 16, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: *, ^ e # são $p < 0,05$ vs Ax, Sx e Lx.

Figura 4.8 - Níveis de ALA na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Ax, Sx, Lx e Vx. N = 11, 7, 22 e 22, respectivamente. Os valores representam a média

± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: *, ^ e # são $p < 0,05$ vs Ax, Sx e Lx.

Figura 4.9 – Actividade da AChE no sangue em indivíduos das populações Lx, Vx. N = 26 e 28, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

Figura 4.10 - Níveis de Pb na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 8 e 23, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney

Figura 4.11 - Níveis de Mn na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 23, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

Figura 4.12 - Níveis de As na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 24, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

Figura 4.13 - Níveis de Pb no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 8 e 21, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

Figura 4.14 - Níveis de Mn no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 17, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

Figura 4.15 - Níveis de As no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 21, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

Figura 4.16 - Níveis de porfirinas na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 7 e 16, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

Figura 4.17 - Níveis de ALA na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 22, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

Figura 4.18 - Actividade da AChE no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 4 e 21, respectivamente. Os valores representam a média ± SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

Figura 4.19 - Representação gráfica, após análise discriminante, da classificação de cada indivíduo nos grupos Ax, Sx, Lx ou Vx utilizando os biomarcadores urinários (Pb-U, As-U, porfirinas e ALA).

Figura 4.20 - Representação gráfica após análise discriminante, da classificação de cada indivíduo nos grupos Ax, Sx, Lx ou Vx utilizando os biomarcadores de efeito na urina (Porfirinas e ALA).

Figura 5.1 - Evolução da concentração média anual de NO_2 por tipologia de estação ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh - Acetilcolina

AChE - Acetilcolinesterase

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ALA - Ácido δ -aminolevulínico

ALAD - Ácido δ -aminolevulínico desidratase

ALAS - Ácido δ -aminolevulínico sintetase

ALA-U - Ácido δ -aminolevulínico na urina

As - Arsénio

As³⁺ - Arsenito

As⁵⁺ - Arseniato

As-S - Arsénio no sangue

As-U - Arsénio na urina

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry

BHE - Barreira hematoencefálica

Ca - Cálcio

CaM - Calmodulina

CAT - Catalase

DA - Dopamina

DMA - Ácido dimetilar-sénico

DOPA - 3,4-dihidroxifenilalanina

FAAS - Espectrofotometria de absorção atômica com chama

GFAAS - Espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite

GPX - Glutathione peroxidase

GR - Glutathione reductase

GSH - Glutathione

HGAAS - Espectrofotometria de absorção atômica em o gerador de hidretos

IARC - International Agency for Research on Cancer

ICP-AES - Espectrofotometria de emissão atômica com plasma de indução acoplado

ICP-MS - Espectrofotometria de massa com plasma de indução acoplado

MMA - Ácido monometilarsênico

MMT - Metilciclopentadienil manganês tricarbonilo

Mn - Manganês

Mn-S - Manganês no sangue

Mn-U - Manganês na urina

NMDA - Ácido N-metil-D-aspartico

OMS - Organização Mundial da Saúde

Pb - Chumbo

Pb-S - Chumbo no sangue

Pb-U - Chumbo na urina

PKC - Proteína cinase C

QI - Quociente de inteligência

ROS - Espécies reactivas de oxigénio

SAM - S-adenosilmetionina

SOD - Superóxido dismutase

TfR - Receptor da transferrina

VLB - Valor limite biológico

CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

1.1 O meio ambiente e o bem-estar

O bem-estar e a saúde da população actual bem como das gerações futuras, estão intimamente relacionados com a qualidade do ambiente envolvente e com o estilo de vida (UNEP, 2016). Nós, enquanto seres humanos, temos várias necessidades biológicas primárias, entre elas a alimentação, água, ar puro, um local de abrigo e constância climática (Corvalan et al., 2005).

Até à segunda metade do século XX, a dimensão da população humana era muito menor, dispersa e com um desenvolvimento tecnológico que não afectava o nosso ambiente local. Contudo, actualmente, devido ao aumento da população mundial e da intensidade no desenvolvimento industrial, as nossas capacidades tecnológicas e as ferramentas desenvolvidas têm afectado fortemente os sistemas ecológicos (Blais et al., 2005).

Vivemos num ambiente em constante mudança; algumas alterações são naturais, mas a maioria pode estar correlacionada com actividades humanas, tais como: agricultura, urbanismo, actividade mineira, e outros aspectos relacionados com desenvolvimento industrial (Blais et al., 2005; Corvalan et al., 2005).

Uma maior prevalência de doenças não contagiosas e crónicas tem sido verificada e está atribuída à exposição a químicos, à má qualidade do ar e aos estilos de vida não saudáveis. Estima-se que estes factores, assim como perturbações dos sistemas hídricos e dos ecossistemas que nos sustentam sejam responsáveis por 23% das mortes a nível mundial (UNEP, 2016).

1.1.1 Contaminação do ambiente por metais

A contaminação ocorre quando uma substância está presente onde ela não deveria normalmente ocorrer, ou quando se encontra em concentrações acima do nível natural num determinado meio ou organismo (Chapman, 2007). Quanto aos contaminantes, foram estabelecidos quatro grandes grupos tendo em conta os seus efeitos negativos na saúde humana, sendo eles: substâncias químicas inorgânicas, compostos orgânicos, elementos radioactivos e microorganismos. Alguns metais tais como: arsénio, chumbo, cobre, manganês, mercúrio, e outros, pertencem ao primeiro grupo, o das substâncias químicas inorgânicas (Ribeiro, 2013).

Nos últimos anos, tem havido uma crescente preocupação ecológica e global na saúde pública relacionada com a contaminação ambiental por metais. A tabela periódica é constituída maioritariamente por metais, e apenas 25 dos seus elementos não possuem quaisquer características metálicas. Alguns destes metais são vitais para a saúde humana, em pequenas quantidades, e por isso são chamados de metais essenciais; outros como os metalóides e a maioria dos metais pesados não desempenham nenhuma função na fisiologia humana e podem causar intoxicações (Rocha et al., 2016; Silva, 2014; Tchounwou et al., 2012).

Estudos epidemiológicos e toxicológicos têm mostrado que metais e metalóides podem acumular-se nos tecidos adiposos, afectar as funções dos órgãos e perturbar os sistemas nervoso e endócrino;

podem ainda interagir directamente com o ácido desoxirribonucleico (ADN), causando mutações. Há por isso uma necessidade urgente de avaliar a exposição a metais pesados, e o seu possível risco para saúde da população em geral (Sun et al., 2017).

Os metais pesados são elementos naturais que se encontram em toda a crosta terrestre, sendo caracterizados por terem um elevado peso atómico, e uma densidade pelo menos cinco vezes superior à da água. Os metais pesados podem ser classificados como: potencialmente tóxicos (alumínio, arsénio, cádmio, chumbo, mercúrio, entre outros), provavelmente essenciais (níquel, cobalto, entre outros) e essenciais (ferro, manganês, cobre, zinco, selénio entre outros.) (Tchounwou et al., 2012; Uluozlu et al., 2008).

Visto que são elementos ubíquos na natureza, os seres humanos podem estar expostos a metais pesados que existem no ar, solo, poeira, água e alimentos através das várias vias de exposição que incluem a ingestão, inalação e absorção dérmica. A poluição ambiental é muito proeminente em áreas específicas como mineração, fundições e outras indústrias metálicas (Rebelo e Caldas, 2016; Tchounwou et al., 2012; Zeng et al., 2016).

Os metais pesados essenciais, como os oligoelementos, são fundamentais para manter a homeostase do metabolismo no organismo humano, dentro de uma gama de valores específicos, pois caso excedam os seus níveis de tolerância, podem provocar efeitos tóxicos, tal como a restante maioria dos metais pesados não essenciais (Uluozlu et al., 2008; Zeng et al., 2016). A exposição diária, aguda e/ou crónica, a um ambiente poluído pode causar acumulação de alguns destes metais pesados no organismo, provocando danos em determinados órgãos ou sistemas (Rocha et al., 2016).

Ao longo das últimas décadas, a incidência de doenças neurológicas tem aumentado. Considerando a persistência e bioacumulação dos metais no meio ambiente e a sua propensão para se acumularem no cérebro, os metais têm sido associados ao desenvolvimento de várias doenças neurodegenerativas. Dado a sua coexistência no solo e atmosfera a exposição a metais como: chumbo (Pb), manganês (Mn) e arsénio (As) não ocorrem de forma isolada; na verdade, a complexidade da exposição a misturas de metais é o mais recorrente. Estes metais são reconhecidos como metais tóxicos que, para além de outros efeitos nefastos, têm a capacidade de facilmente atravessar a barreira hematoencefálica (BHE), podendo provocar uma série de desordens neurodegenerativas, que serão aprofundadas mais a adiante (Andrade et al., 2013; Andrade et al., 2015).

1.2. Chumbo

1.2.1 Considerações gerais

O Pb é um elemento não essencial, considerado um dos metais pesados mais abundantes e tóxicos (Liang e Mao, 2015). Este metal encontra-se amplamente distribuído e mobilizado no meio ambiente, sendo que a sua exposição e absorção é um grave problema de saúde pública (Tong et al., 2000). Estima-se que 0,6% da carga global de doenças é atribuída à exposição de Pb (WHO, 2010).

Contudo, ao longo das últimas décadas as emissões de Pb têm diminuído significativamente, principalmente nos países desenvolvidos, devido à proibição de utilização do aditivo de Pb (tetraetilchumbo) na gasolina. Devido a esta interdição, tem-se verificado uma diminuição nos níveis

de Pb no sangue da população em geral, principalmente nas crianças (Andrade et al., 2013; Barbosa et al., 2005).

Na sua forma natural, o Pb é um metal de cor cinza azulado que ocorre na crosta terrestre. Este metal apresenta três estados de oxidação: Pb, o metal, que raramente é encontrado na natureza nesta forma; o Pb^{2+} que é a forma mais comum e o Pb^{4+} que só é formado em condições extremamente oxidantes, e por isso não é vulgarmente encontrado no meio ambiente (ATSDR, 2007a). Este elemento é um metal macio, maleável e solúvel em água, embora a sua solubilidade varie consoante a dureza, temperatura e acidez da água (Hanna-Attisha et al., 2016; Mason et al., 2014).

1.2.2 Aplicações

Por ser um metal versátil e ubíquo, o Pb é utilizado há muitos séculos, tendo sido utilizado fundamentalmente nos recipientes para alimentos e no armazenamento do vinho na antiga Civilização Romana (Tong et al., 2000). Mais recentemente, durante a Revolução Industrial, os compostos de Pb eram utilizados como pigmentos para tintas, corantes, esmaltes de cerâmica, canalização para transporte de água, fabrico de pilhas e como aditivo para a gasolina (ATSDR, 2007a).

1.2.3 Fontes e vias de exposição

A grande maioria do Pb que está presente no meio ambiente tem origem antropogénica. Como já foi mencionado, durante a Revolução Industrial o Pb foi introduzido numa série de produtos o que provocou um aumento substancial deste metal (Hanna-Attisha et al., 2016; Liang e Mao, 2015). Contudo, actualmente, muitos países já não permitem a comercialização nem a utilização de alguns destes produtos. No entanto, em diversos países menos desenvolvidos ainda possibilitam a sua venda e utilização em diferentes contextos, e como tal, a exposição a este metal ainda é muito elevada (Bakulski et al., 2002).

Hoje em dia, a exposição ao Pb ocorre através dos alimentos e água contaminados e poeiras, devido à deposição do Pb atmosférico, bem como a lixiviação do Pb (Barbosa et al., 2005; Hanna-Attisha et al., 2016; Tong et al., 2000). Actividades industriais como a reciclagem de metal, incineração, processos de fundição, o fabrico de baterias (Bakulski et al., 2002; Barbosa et al., 2005), actividade mineira, produtos cosméticos e cerâmica, constituem também fontes de exposição (Chen et al., 2017). Alguns estudos já reportaram a presença de Pb em alguns doces e chocolates, uma vez que a casca do grão de cacau tem uma grande capacidade de absorver o Pb atmosférico (Devi et al., 2016).

Quanto às vias de exposição para os humanos passam pela via oral através do consumo de alimentos e/ou água contaminada, de ingestão de solo (principalmente no caso das crianças), pela inalação de poeiras e pela absorção dérmica (Liang e Mao, 2015; Tong et al., 2000). Destas vias de exposição a inalatória é a mais eficaz, contudo a ingestão é a via predominante (Bakulski et al., 2012; Neal e Guilarte, 2013; Sadão, 2002).

1.2.4 Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

Após a entrada do Pb no organismo, este metal é absorvido dependendo da via e da sua biodisponibilidade (Barbosa et al., 2005). Se o Pb for inalado a absorção é feita pelo epitélio pulmonar, se for por ingestão, a absorção ocorre através do tracto gastrointestinal (Bakulski et al., 2012; Neal e Guilarte, 2013).

Após a absorção, a grande maioria do Pb^{2+} no sangue (cerca de 90%), está ligado às proteínas ou a fracções destas (hemoglobina e outras proteínas de baixo peso molecular), e o restante encontra-se no plasma, ligado à albumina ou como iões livres, entrando assim na corrente sanguínea e sendo disperso por todo o organismo. Estudos defendem que este ião consegue atravessar a BHE depositando-se no cérebro (Neal e Guilarte, 2013; Sadão, 2002). Quanto à maioria do Pb ligado às proteínas é distribuído pelos tecidos moles do organismo (Bakulski et al., 2012; Mason et al., 2014), sendo posteriormente redistribuído e depositado maioritariamente nos ossos, e uma pequena percentagem armazenada nos dentes e cabelo (Sadão, 2002).

No processo da troca catiónica, o Pb^{2+} ocupa os locais dos iões cálcio (Ca^{2+}) na matriz óssea permitindo assim a sua incorporação no tecido ósseo (Bakulski et al., 2012; Neal e Guilarte, 2013). Sabe-se que o Pb armazenado nos ossos, corresponde a cerca de 95% da carga corporal num adulto, e tem uma meia-vida que pode variar entre 20 a 30 anos, uma vez que a renovação dos ossos corticais é lenta (Bakulski et al., 2012; Mason et al., 2014).

O Pb presente no esqueleto é biologicamente inerte (Sadão, 2002). Contudo, aquando da movimentação óssea do Pb, que ocorre naturalmente, variando a sua velocidade consoante a tipologia do osso (osso trabecular – movimentação rápida; se for osso compacto- movimentação lenta), o Pb é mobilizado e volta novamente para a corrente sanguínea, podendo levar a sintomas tóxicos, mesmo que a exposição tenha cessado. Para além disto, em situações particulares como estados de gravidez, lactação, menopausa ou osteoporose a taxa de movimentação óssea do Pb é superior à normal, aumentando assim, os níveis de Pb no sangue, tornando-os grupos mais susceptíveis à toxicidade do Pb (Barbosa et al., 2005; Mason et al., 2014; Sadão, 2002).

A excreção do Pb pelo organismo pode ser feita utilizando várias vias, destacando-se, no entanto, a excreção renal e gastrointestinal. Estima-se que pela urina seja excretado cerca de 80% do Pb ingerido e apenas 15% eliminado pelas fezes, bÍlis e secreções do tracto gastrointestinal (Mason et al., 2014; Neal and Guilarte, 2013; Sadão, 2002). Uma quantidade menor (cerca de 5% do Pb) pode também ser eliminada do organismo através de suor, cabelo, unhas, leite materno e descamação da pele (Neal e Guilarte, 2013; Sadão, 2002).

1.2.5 Efeitos tóxicos

O Pb é um metal tóxico, sendo os efeitos biológicos dependentes do nível e duração da exposição a este metal (Jakubowski, 2011). A exposição aguda a Pb, isto é, exposição a elevados níveis durante um curto espaço de tempo, pode provocar sintomas como: anorexia, náusea, vómitos, dor abdominal, danos hepáticos e renais, hipertensão e efeitos neurológicos (mal-estar, sonolência e encefalopatia); numa situação mais grave, a exposição aguda ao Pb pode levar à morte (Jakubowski, 2011; Mason et al., 2014; WHO, 2010).

Aquando de uma exposição crónica, exposição ao Pb a níveis mais baixos mas de modo prolongado, surgem habitualmente problemas como anemia, fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, letargia, convulsões, fraqueza muscular, ataxia, tremores e paralisia. Afecta também o sistema reprodutor no homem, diminuindo o número de espermatozóides e aumentando o número de espermatozóides inviáveis (Devi et al., 2016; Tong et al., 2000; WHO 2010). O Pb pode provocar danos renais, modificando a morfologia das células do túbulo proximal. Em casos de intoxicação aguda pode mesmo limitar a função renal (Rocha, 2008).

- **Efeitos Neurotóxicos**

A neurotoxicidade é a capacidade de uma agente químico, físico ou biológico causar efeitos adversos a nível da estrutura ou funções do sistema nervoso, tais como: alterações cognitivas, motoras, distúrbios na memória e mudanças no humor ou início de distúrbios psiquiátricos (ATSDR, 2007a; Mason et al., 2014).

Os sintomas neurotóxicos estão frequentemente associados a pessoas expostas cronicamente, sendo as manifestações prevalentes: o aumento da depressão, ansiedade e irritabilidade, redução na coordenação motora fina e manifestações neurodegenerativas (Chibowska et al., 2016; Mason et al., 2014). Numa situação aguda, em que há uma exposição a Pb em doses muito elevadas, pode conduzir ao desenvolvimento de uma encefalopatia, o efeito neurológico mais severo da exposição ao Pb. As crianças, que são um grupo mais susceptível, podem desenvolvê-la mesmo estando expostas a níveis de Pb mais baixos do que os adultos.

Numa primeira fase do desenvolvimento da encefalopatia, os indivíduos apresentam sintomas como: irritabilidade, dor de cabeça, dificuldade de atenção, perda de memória, tremor e alucinações. Após algumas semanas de exposição, os sintomas agravam-se abruptamente podendo levar a paralisia, convulsões, delírio, coma e morte (Mason et al., 2014). No caso das crianças, a neurotoxicidade do Pb tem maior impacto, uma vez que o seu cérebro está em desenvolvimento, podendo manifestar-se pelo decréscimo do Quociente de Inteligência (QI), das funções cognitivas, problemas a nível comportamental, memória e aprendizagem. Há evidências que na fase adulta, se verifica uma redução da massa cinzenta, especialmente no córtex pré-frontal (Bakulski et al., 2012; Jakubowski, 2011).

1.2.6 Mecanismos de toxicidade

Como já foi mencionado, a exposição ao Pb pode induzir diversos efeitos tóxicos em humanos dependendo da dose e duração da exposição. A sua toxicidade deve-se fundamentalmente à sua interferência com o normal funcionamento das membranas celulares e das enzimas (Casarett, 2013; Moreira e Moreira, 2004). Alguns mecanismos induzidos pela neurotoxicidade de Pb são: stress oxidativo, alterações físicas e biológicas da membrana, desregulação dos sinais celulares e de neurotransmissores (Sanders et al., 2009).

Entre estes mecanismos, os danos oxidativos são provavelmente o processo mais importante de neurotoxicidade de Pb. Evidências experimentais sugerem que o Pb induz stress oxidativo provocando alguns efeitos tóxicos através da disrupção do balanço redox, o que pode levar a uma lesão cerebral. A

exposição ao Pb pode induzir alterações na actividade de enzimas antioxidantes, diminuindo ou até mesmo inibindo por completo a sua actividade, como é o caso da glutathiona (GSH), principalmente devido à elevada afinidade de Pb para grupos sulfidrílo. O Pb pode ainda inactivar enzimas como a glutathiona redutase (GR), glutathiona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (Moreira e Moreira, 2004).

Outro mecanismo de neurotoxicidade do Pb está relacionado com a sua capacidade de imitar ou desregular a homeostasia do cálcio (Ca). O Ca em condições fisiológicas, é fundamental em vários processos celulares, tais como: o crescimento e diferenciação celular, a sinalização neuronal e transdução do sinal intracelular (Sanders et al., 2009; Tchounwou et al., 2012). O Pb desregula o ciclo intracelular do Ca, aumentando assim alguns eventos dependentes de Ca, através da calmodulina (CaM) e proteína cinase C (PKC). Quando o Ca extracelular entra na célula este combina-se com a CaM, um mensageiro secundário, que actua em diversas vias de sinalização celular. O Pb tem elevada afinidade com a CaM mesmo em baixas concentrações. Desta forma o Pb vai promover a activação da CaM, desencadeando vários processos dependentes da mesma, entre os quais, processos de fosforilação e desfosforilação, alteração do equilíbrio de formação e degradação de proteínas sinalizadoras tais como o AMP cíclico ou o óxido nítrico. Também participa na modelação de diversos canais iónicos, tais como o ácido N-metil-D-aspartico (NMDA), os canais de Ca e os canais de potássio (Brochin et al., 2008; Marchetti, 2003; Nava-Ruiz et al., 2012; Sanders et al., 2009; Tchounwou et al., 2012). A PKC está envolvida na transmissão sináptica, síntese de neurotransmissores e na ramificação dendrítica, entre outras funções (ATSDR, 2007a; Brochin et al., 2008; Nava-Ruiz et al., 2012; Sanders et al., 2009).

Para além de todos estes efeitos, o Pb pode também interferir com os sistemas de neurotransmissão, tais como, o GABAérgico, o dopaminérgico e o colinérgico, estando por isso envolvidos nos processos que conduzem à neurotoxicidade (Marchetti, 2003; Mason et al., 2014).

1.2.7 Estudos epidemiológicos

Ao longo dos anos inúmeros estudos têm sido feitos com o intuito de melhor compreender os efeitos do Pb no nosso organismo, bem como as suas consequências.

As grávidas e as crianças são os grupos mais vulneráveis à exposição por Pb. No caso das grávidas, tal como foi verificado no estudo de Goyer (1990), os níveis de Pb na gestante e no feto são praticamente iguais, sugerindo que a placenta é uma barreira pouco eficaz ao transporte de Pb para o feto, o que promove a exposição uterina. As estruturas celulares do feto ainda estão em desenvolvimento, e a presença do Pb irá comprometer o normal desenvolvimento neonatal. No estudo de Graziano e col. (1990) também se verifica esta relação linear entre os valores de Pb no sangue materno e no sangue do cordão umbilical.

Neste mesmo estudo (Graziano et al.,1990) quantificaram-se os níveis de Pb no sangue de grávidas que moravam numa cidade industrial no Kosovo, verificando-se que, tal como esperado, os seus níveis eram em média duas vezes superiores aos do grupo de grávidas controlo. Concluiu-se também que as gestantes que moravam mais próximo da zona industrial eram as que apresentavam níveis de Pb mais elevados; foi ainda observado que as grávidas que tinham maridos que trabalhavam em indústrias expostas a Pb apresentavam níveis de Pb significativamente mais altos, independentemente do local da

sua residência. Neste estudo, ao analisarem o Pb no soro materno verificaram que estava associado a níveis de Pb mais baixos quando havia níveis de ferritina elevados, o que significa que o ferro pode ajudar a inibir a absorção do Pb, sendo assim importante adicioná-lo à sua alimentação no sentido preventivo (Graziano et al., 1990).

Noutro estudo com grávidas em que foram quantificados os níveis de Pb no sangue desde a 12^a até à 36^a semana, depois novamente no parto, verificaram-se vários aumentos significativos nos níveis médios de Pb no sangue a partir da 20^a semana até ao parto. Os autores tentaram justificar esta tendência devido à mobilização do Pb do osso e ao aumento da absorção intestinal (Rothenberg et al., 1994).

Por outro lado, as implicações na saúde pública da exposição a baixos níveis de Pb em crianças, continuam a suscitar grande preocupação em muitos países. No estudo de Pocock e col. (1994) verificou-se um défice no QI em crianças com mais de 5 anos com elevada carga corporal de Pb, mas não foi avaliado o posterior impacto real no seu desenvolvimento neuropsicológico (Pocock et al., 1994).

Num estudo longitudinal foram medidos os níveis de Pb presentes na dentina em crianças, e 11 anos depois foi feita uma reavaliação tendo-se verificado danos na função neurocomportamental. Os jovens com níveis de Pb na dentina superiores a 20ppm, têm um elevado risco de abandono escolar, e maior dificuldade na leitura, comparativamente aos que têm níveis de Pb na dentina inferiores a 10ppm. Exposição a elevados níveis de Pb na infância está também significativamente associado a baixo rendimento escolar, dificuldades a nível de vocabulário e raciocínio gramatical, baixa coordenação visual-motora, e prolongamento dos tempos de reacção. Concluiu-se que a exposição a Pb em crianças está associada a défices no funcionamento do sistema nervoso central, que persistem até à fase de jovens adulto (Needleman et al., 1990).

No estudo de Nash e col. (2003) foi analisada a relação entre o Pb e a tensão arterial nomeadamente a prevalência da hipertensão em populações de mulheres pré- e pós-menopausa nos E.U.A. Verificou-se que o nível de Pb no sangue está associado positivamente à tensão arterial e a riscos de hipertensão entre mulheres de 40 a 59 anos, e que a relação entre o nível de Pb no sangue e a hipertensão sistólica e diastólica é mais pronunciada em mulheres na pós-menopausa (Nash et al., 2003).

Um estudo em homens de meia idade e idosos demonstraram que níveis mais elevados de Pb no sangue e osso esteve na origem de um pior desempenho nos testes cognitivos que testavam a velocidade de reacção, memória, linguagem e percepção espacial comparativamente ao grupo controlo. Este estudo concluiu que elevados níveis de Pb contribuem para deficiências na função cognitiva em homens idosos (Payton et al., 1998).

Nos E.U.A entre 1976 e 1991 os níveis médios de Pb no sangue da população em geral (com idades compreendidas entre 1 e 74 anos) caiu cerca de 78% (de 12,8 para 2,8 µg/dL), e os níveis médios do Pb no caso das crianças até 5 anos também diminuiu cerca de 77% (descendo de 13,7 para 3,2 µg/dL). A maior causa para este declínio está relacionada principalmente com a remoção de 99,8% do Pb da gasolina e a remoção do Pb das latas para alimentos; de acordo com este estudo, houve por isso um grande progresso na diminuição da exposição ao Pb nestas populações (Pirkle et al., 1994).

1.3. Manganês

1.3.1 Considerações gerais

O Mn é o 12º elemento mais abundante da Terra (O’Neal e Zheng, 2015). O Mn puro tem uma cor prateada, não ocorrendo na natureza sob a sua forma elementar, mas combinado com outras substâncias como o ferro, oxigénio, enxofre ou cloro. Está largamente distribuído na natureza, sendo um componente metálico presente em muitos tipos de rocha (Lucas, 2010). Tal como os outros metais, o Mn não se degrada no meio ambiente, apenas vai alterando a sua forma química, fundindo-se ou separando-se em partículas.

Na tabela periódica tem o número atómico 25, é elemento do grupo 7 do 4º período, sendo um dos metais de transição. O seu ponto de fusão é de 1 245°C, o ponto de ebulição próximo dos 2 100°C e a sua densidade é de 7,47 g/cm³ (Lucas, 2010).

1.3.2 Manganês: elemento essencial

O Mn é um oligoelemento essencial necessário para o normal desenvolvimento e uma boa saúde do ser humano (ATSDR, 2012), sendo crucial em vários aspectos da saúde humana (Golasik et al., 2014; González-Merizalde et al., 2016). Está presente em todos os tecidos, sendo fundamental em vários processos fisiológicos do organismo, tais como: função imunitária, regulação da energia celular, reprodução, digestão, crescimento ósseo, desenvolvimento da cartilagem e tecido conjuntivo, funcionamento neuronal, coagulação sanguínea e regulação da glicose no sangue e vitaminas (O’Neal e Zheng, 2015; Santos et al., 2014; Yoon et al., 2011).

O Mn tem um papel importante como cofactor em muitas reacções enzimáticas, muitas delas envolvidas nos processos de metabolismo dos aminoácidos, lípidos, proteínas e hidratos de carbono. Também é utilizado em várias enzimas antioxidantes, como a SOD, e activa a glicosiltransferase, essencial para o crescimento do tecido ósseo e conjuntivo (Soldin and Aschner, 2007; Yoon et al., 2011). Como tal, o Mn é essencial para um bom desenvolvimento pré-natal e neonatal, podendo a sua deficiência causar anormalidades esqueléticas, bem como perturbações na função cerebral (Yoon et al., 2011). Nos adultos, apesar de ser rara, pode também haver deficiência do Mn que poderá resultar em má formação óssea, fertilidade reduzida, intolerância à glicose, dermatites, e alteração no metabolismo dos lípidos e dos hidratos de carbono (Santamaria e Sulsk, 2010; Soldin e Aschner, 2007).

Embora o Mn desempenhe muitas funções fisiológicas no corpo humano, a níveis elevados pode ser tóxico para muitos sistemas e órgãos. Nas crianças, uma exposição precoce de Mn pode afectar negativamente o desenvolvimento neurológico durante a infância. Enquanto nos adultos o efeito mais comum é o desenvolvimento da síndrome neurológica semelhante à doença de Parkinson, o manganismo (Neal e Guilarte, 2013; O’Neal e Zheng, 2015).

1.3.3 Aplicações

O Mn é utilizado principalmente no sector industrial, na produção de ferro, alumínio, cobre, zinco e aço conferindo maior dureza, rigidez e resistência aos materiais (ATSDR, 2012; Lucas, 2010). Este metal é usado também no fabrico de outros produtos, tais como: fogo de artifício, fertilizantes, fungicidas, pilhas, vidro, na produção de couro e têxteis, tintas, cosméticos e também como agente em imagiologia de diagnóstico médico (ATSDR, 2012). Um composto orgânico de Mn, o metilciclopentadienil manganês tricarbonilo (MMT), um aditivo da gasolina, age como potenciador das octanas, sendo um agente antidetonante ou inibidor de fumo (Lucas, 2010).

1.3.4 Fontes e vias de exposição

Sendo o Mn um componente natural do ambiente, a população de um modo geral está exposta a este metal. Uma das principais formas de exposição está relacionada com o consumo de alimentos ricos neste metal, tais como: o grão, feijão, nozes, trigo, soja, arroz e folhas de chá. Indivíduos que consomem maiores quantidades destes alimentos, podem ter níveis de Mn no organismo mais elevados do que as restantes pessoas, como é o caso dos vegetarianos. A ingestão de água, com níveis superiores deste metal, também constituiu uma fonte de exposição, embora menos significativa (ATSDR, 2012; Lucas, 2010). Assim, a ingestão é considerada a via de exposição com maior impacto, permitindo a entrada do Mn no organismo através do tracto digestivo, ficando disponível para as necessidades básicas do funcionamento normal. Porém, se este consumo for em excesso e de forma continuada, poderá dar origem a efeitos tóxicos (Santamaria, 2008).

A presença do Mn no ar ocorre maioritariamente em ambientes ocupacionais, resultado da exploração mineira, produção de aço e outras ligas metálicas; estando estes trabalhadores expostos fundamentalmente pela inalação deste metal. Contudo, o Mn também pode concentrar-se no ar atmosférico devido à queima de gasolina, que liberta MMT pelo fumo dos escapes dos automóveis. Estudos, com populações canadianas, já associaram esta exposição a efeitos neurotóxicos (Lucas, 2010). Para além destas fontes antropogénicas, o Mn no ar também pode ser de origem natural resultado da erosão das rochas e solos (ATSDR, 2012).

Apesar de menos comum, a pele tem a capacidade de absorver pequenas quantidades deste metal, sendo o contacto dérmico também uma via de exposição (Santamaria e Sulsk, 2010).

1.3.5 Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção;

Sendo o tracto gastrointestinal uma das importantes vias de absorção, a homeostase do Mn no organismo é mantida graças à regulação da sua absorção no intestino e à excreção biliar. Por outro lado, quando a entrada do metal no organismo ocorre pela via inalatória, a sua assimilação pode ocorrer através dos alvéolos pulmonares. Existem também evidências da capacidade do Mn puder entrar no cérebro através do tracto olfactivo, passando a BHE (Guarneros et al., 2013; Kałwa e Habrat, 2015; O’Neal e Zheng, 2015; Yoon et al., 2011).

A ingestão da quantidade de Mn necessário nas dietas ocidentais varia entre os valores de 2,3 e 8,8 mg/dia, contudo, e de um modo geral, apenas 1 a 5% do Mn ingerido é absorvido pelos adultos (Yoon et al., 2011). Uma das justificações para esta baixa taxa de absorção, pode estar relacionada com o facto do Mn e o ferro terem características electroquímicas semelhantes e competirem pelos mesmo mecanismos de absorção intestinal. Assim, quando os níveis de ferro estão mais elevados, a absorção do Mn é menos eficaz (Casarett, 2013; González-Merizalde et al., 2016).

No corpo humano o Mn está presente fundamentalmente em dois estados de oxidação: Mn^{2+} e Mn^{3+} . No sangue, o Mn^{2+} está ligado a fracções com elevado peso molecular, tais como a albumina e a β -globulina; quanto ao Mn^{3+} , a maior parte está ligado à transferrina, formando assim um complexo mais estável (O'Neal e Zheng, 2015). O transportador bivalente DMT1 é o principal responsável pela entrada do Mn^{2+} no cérebro. Outras proteínas transportadoras, as ZIP, são também mencionadas como mecanismo de transporte de Mn^{2+} para o cérebro; há ainda estudos que referem que o Mn^{2+} pode entrar no cérebro através dos canais de Ca. Quanto ao Mn^{3+} complexado com a transferrina, entra no cérebro com o auxílio do receptor da transferrina (TfR) (O'Neal e Zheng, 2015). O cérebro é um dos órgãos onde o Mn se deposita em grande quantidade em estruturas como o globo pálido e os núcleos de base, para além deste, este metal também se acumula no pâncreas, fígado, rim, intestino, osso, glândulas supra-renais e hipófise (Casarett, 2013; O'Neal e Zheng, 2015).

O Mn é metabolizado no fígado e posteriormente eliminado do organismo pelas fezes, sendo esta a sua principal fonte de excreção. Pode também ser excretado pela bília e ainda pequenas doses podem ser expelidas pelo sistema urinário. Outras vias de excreção do Mn secundárias são o leite materno e o suor (Casarett, 2013; Golasik et al., 2014; O'Neal e Zheng, 2015).

1.3.6 Efeitos tóxicos

Vários estudos epidemiológicos evidenciam os efeitos resultantes da exposição ao Mn, ao nível do sistema respiratório, reprodutivo e neurológico, destacando-se os efeitos neurocomportamentais, associados a distúrbios motores, como o manganismo (González-Merizalde et al., 2016; Lucas, 2010).

A toxicidade do Mn está muitas vezes relacionada com a exposição ocupacional (Soldin e Aschner, 2007). Nesta, mesmo em baixas concentrações de Mn, verificam-se efeitos tóxicos, por exemplo ao nível do tracto respiratório. (Lucas, 2010) A inalação de partículas de compostos de Mn pode originar sintomas respiratórios como tosse, bronquite, pneumonia, diminuição da função olfactiva, asma e insuficiência pulmonar. Estes efeitos podem reflectir uma resposta indirecta à inalação de material particulado ou podem estar associados à toxicidade pulmonar directa provocada pelo Mn (ATSDR, 2012; Guarneros et al., 2013; Lucas, 2010; Soldin e Aschner, 2007).

Sintomas ao nível do sistema reprodutor como, disfunção sexual, diminuição da mobilidade dos espermatozóides e alterações na qualidade do esperma, têm sido observados em indivíduos que trabalham em locais onde os níveis de Mn são elevados (ATSDR, 2012; Lucas, 2010).

- **Efeitos neurotóxicos – Manganismo**

A acumulação do Mn no sistema nervoso central pode resultar numa síndrome associada à neurotoxicidade do Mn, designada manganismo (Racette et al., 2012). Esta doença manifesta-se após a exposição a elevados níveis de Mn, uma síndrome com semelhanças à Doença de Parkinson (Finkelstein e Jerrett, 2007). O manganismo é uma preocupação quer em ambientes ocupacionais quer ambientais. Contudo, predomina no sector ocupacional, uma vez que a exposição é habitualmente mais elevada e de forma prolongada no tempo (Finkelstein e Jerrett, 2007).

Esta síndrome neurológica caracteriza-se pelo aparecimento de sintomas neuropsiquiátricos e extrapiramidais, tais como: psicose, desorientação, diminuição da memória e capacidade de discernimento, ansiedade, instabilidade emocional, comportamento compulsivo, confusão, alucinações e delírios. Mais tarde, pode surgir lentidão dos movimentos voluntários (bradicinesia), rigidez muscular, alterações na postura corporal, declínio cognitivo com aumento do tempo de reacção, distúrbios na marcha e no equilíbrio, espasmos musculares prolongados (dystonia) e salivação excessiva (Finkelstein e Jerrett, 2007; González-Merizalde et al., 2016; Kałwa e Habrat, 2015; Racette, 2014). O desenvolvimento desta síndrome extrapiramidal provoca danos permanentes no sistema nervoso central, não havendo uma terapêutica eficaz estabelecida; como tal, o diagnóstico precoce dos efeitos neurotóxicos do Mn, particularmente em ambientes ocupacionais, é essencial (Jiang et al., 2006).

Quanto às semelhanças com a doença de Parkinson os sintomas partilhados são principalmente a bradicinesia, rigidez, disfunção cognitiva, distúrbios comportamentais, instabilidade emocional, psicose e dystonia (Finkelstein e Jerrett, 2007; Racette, 2014). Por outro lado, as diferenças a nível somático que permitem distinguir estas duas síndromes são essencialmente o facto de no manganismo normalmente não ocorrer tremores em repouso, e a dystonia e sintomas de retropulsão serem mais frequentes em pacientes com a Doença de Parkinson (Finkelstein e Jerrett, 2007). Outra grande diferença está no facto de o manganismo não provocar danos fisiológicos no sistema dopaminérgico, enquanto na doença de Parkinson este é um dos principais alvos do sistema nervoso central (Racette et al 2014). Outra característica que diferencia estas síndromes passa pela resposta à levodopa, terapêutica subscrita para os pacientes com a Doença de Parkinson. Uma vez que há diminuição das concentrações de dopamina (DA) devido à degeneração da substância negra, a suplementação com levodopa compensa essa perda. Por outro lado, como o manganismo não afecta as células da substância negra, esta terapêutica não surte efeitos no tratamento desta síndrome (Racette, 2014). Os danos no sistema nervoso central, em casos de neurotoxicidade por Mn, foram verificados principalmente nos gânglios basais, no corpo estriado e no corpo pálido (Finkelstein e Jerrett, 2007; Racette, 2014).

1.3.7 Mecanismos de toxicidade

Há inúmeros mecanismos celulares e moleculares responsáveis pela toxicidade e neurotoxicidade do Mn (Finkelstein e Jerrett, 2007). No cérebro o Mn acumula-se principalmente nos neurónios, astrócitos e oligodendrócitos das estruturas onde há concentrações mais elevadas de ferro não-heme, tais como: núcleo caudado e putamen, globo pálido, substância negra e núcleo subtalâmico (Neal e Guilarte, 2013; Soldin e Aschner, 2007).

O Mn em níveis fisiológicos normais previne o stress oxidativo, contudo, quando em excesso, promove a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS); consequentemente, o aumento do stress oxidativo irá originar danos nas células dopaminérgicas, principalmente da substância negra (Nascimento et al., 2016; Soldin e Aschner, 2007). A oxidação da DA no cérebro pelas ROS como resultado da exposição ao Mn, tem sido associada à diminuição dos níveis de grupos tiol (-SH) e hidroxilo em importantes moléculas biológicas; esta situação pode levar à inibição de algumas enzimas que contêm, por exemplo grupos sulfidrílo, como é o caso do ácido δ -aminolevulínico desidratase (ALAD), uma enzima envolvida na via da biossíntese do heme, onde os grupos -SH são essenciais para a sua óptima actividade (Nascimento et al., 2016; Neal e Guilarte, 2013).

Para além da DA, verificou-se também que a neurotoxicidade do Mn tem origem na disfunção de neurotransmissores, tais como, a serotonina, GABA, norepinefrina e acetilcolina (ACh), afectando a sua libertação na fenda sináptica ou a sua ligação aos receptores pós-sinápticos (Finkelstein e Jerrett, 2007).

1.3.8 Estudos epidemiológicos

Uma exposição excessiva ao Mn pode causar efeitos neurotóxicos incluindo danos psiquiátricos. Vários estudos têm mostrado alterações a nível motor e neurocomportamental associado à exposição de Mn no local de trabalho, como é o exemplo do estudo de Bowler e col. (2003); neste estudo foram comparadas as funções neurofisiológicas, estado emocional e visão num grupo composto por antigos e actuais trabalhadores de uma industria de soldagem (com uma média de 25 anos de serviço), e um grupo de controlo, que não estava expostos e nunca tinha trabalhado numa industria de soldagem. Relativamente aos resultados, verificou-se que o grupo dos trabalhadores apresentou um estado emocional mais debilitado. Quanto aos seus desempenhos nos testes de competência verbal, capacidades visual-motoras e visual-espaciais, processamento de informação e eficiência motora, tiveram um pior desempenho comparativamente ao grupo controlo. Dentro do grupo dos trabalhadores, o número de horas de serviço revelou uma relação negativa com as pontuações dos testes de competência verbal, audição, memória funcional, capacidade cognitiva e eficiência motora.

Quanto à exposição ambiental, também têm sido desenvolvidos estudos que analisam o impacto para a população da presença do Mn no ambiente. O estudo de Rodríguez-Agudelo e col. (2006) analisou o risco de surgimento de perturbações motoras em populações que viviam perto de uma zona de mineração no México. Estudaram oito comunidades que estavam a diferentes distâncias do local da extracção do Mn ou das instalações do processamento do minério. Para tal, mediram as concentrações de Mn nas partículas do ar, na água, no solo e nas culturas agrícolas e avaliaram as possíveis vias de exposição do Mn. De modo a completar a análise da exposição, foram recolhidas amostras de sangue das pessoas que pertenciam às populações em estudo. Os autores encontraram uma associação entre as concentrações de Mn no sangue e os testes motores, bem como uma diferença significativa associada às concentrações de Mn no ar e os testes de coordenação motora. Os resultados deste estudo mostraram que as pessoas que vivem perto das minas e das instalações não apresentam distúrbios neurológicos, mas sofrem de um défice motor incipiente, devido à inalação de poeiras ricas em Mn.

Um estudo semelhante, encontrou uma evidente associação entre a exposição crónica ao Mn através do ar pelos residentes adultos, há mais de dez anos, numa comunidade perto de uma indústria de ferro-mangânês, e os défices na função motora e tremor da mão (Bowler et al. 2016).

No âmbito da exposição ao Mn presente no ar devido a emissões industriais e à combustão do MMT, composto de Mn como aditivo na gasolina, o estudo de Finkelstein e Jerrett (2007) avaliou o modo como estas fontes poderiam aumentar o risco da população relativamente à doença de Parkinson. Estes autores encontraram uma associação entre os níveis ambientais de Mn no ar e o risco da Doença de Parkinson, sugerindo que a exposição a este metal pode contribuir para um surgimento mais precoce da doença, provavelmente devido ao Mn acelerar o processo natural da perda de neurónios, que está associado ao envelhecimento.

Em estudos do impacto ambiental do Mn no bem-estar das crianças, existem alguns que relacionam as concentrações de Mn na água de consumo e o QI das crianças que a ingerem, sendo os resultados semelhantes em alguns estudos. Verificou-se também que o aumento das concentrações do Mn na água estava associado ao aumento de concentrações de Mn no cabelo e igualmente relacionado com as baixas pontuações nos testes do QI e no domínio verbal (Betancourt et al., 2015; Bouchard et al., 2010).

No estudo de Bouchard e col. (2010) para além da análise das concentrações de Mn na água de consumo, também examinaram as concentrações do Mn no cabelo relacionados com o Mn ingerido através da alimentação; verificando que os níveis deste metal no cabelo não variaram significativamente com o consumo do Mn. Estes resultados sugerem que as concentrações deste metal se podem acumular no organismo a níveis tóxicos, devido a uma exposição prolongada e contínua, mesmo que a baixos níveis.

1.4. Arsénio

1.4.1 Considerações gerais

O As é um elemento que ocorre naturalmente e está amplamente distribuído por toda a crosta terrestre, sendo o 20º elemento mais abundante da Terra. É um dos metais pesados que mais preocupam tanto a nível ecológico como relativamente à saúde humana (ATSDR, 2007b; Jaishankar et al., 2014).

O As é considerado cancerígeno segundo a “*International Agency for Research on Cancer*” (IARC). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que no mundo cerca de 200 milhões de pessoas estão cronicamente expostas a As, a níveis acima dos propostos como seguros (Tolins et al., 2014). Há estudos que sugerem que mesmo em concentrações baixas, o As aumenta a susceptibilidade relativamente às disfunções cognitivas (Liang et al., 2017; Tyler e Allan 2014).

Do ponto de vista químico, o As é classificado como metalóide, pois apresenta propriedades de metal e não-metal; contudo é frequentemente referenciado como um metal. A sua forma elementar, também chamado de As metálico, é um material sólido cinza metálico. Tal como outros metais, não se degrada no ambiente, podendo apenas mudar a sua forma química. (ATSDR, 2007b).

A sua química é complexa, pois existem inúmeros compostos de As, com diferentes estados de oxidação e toxicidade. O As elementar está comumente presente nas formas trivalente e pentavalente, designadas por arsenito (As^{3+}) e arseniato (As^{5+}), respectivamente, sendo o As^{3+} a sua forma mais tóxica (Andrade et al., 2015). Regra geral, o As é encontrado no ambiente combinado com outros elementos, como o oxigénio, cloro e enxofre, sendo chamado de As inorgânico. Quando combinado

com carbono e hidrogénio é chamado de As orgânico. A maioria dos compostos de As são solúveis em água, sendo assim introduzido em lagos, rios ou águas subterrâneas (ATSDR, 2007b).

1.4.2 Aplicações

Actualmente, cerca de 90% do todo o As produzido é utilizado para preservação de madeiras, tornando-as mais resistentes à podridão e decaimento. Anteriormente, os compostos de As inorgânico eram predominantemente utilizados como pesticidas, principalmente em campos de produção de algodão e pomares. Embora estes compostos já não possam ser utilizados na agricultura, ainda se comercializam pesticidas com compostos orgânicos de As. Actualmente, o As é utilizado na produção de ligas metálicas e na fundição de metais não ferrosos (Andrade et al., 2015; ATSDR, 2007b).

1.4.3 Fontes e vias de exposição

O As ocorre naturalmente no solo e nos minerais e pode ir para a atmosfera, água e solo sendo transportado pelo vento, nas poeiras, e passar para a água por erosão das rochas, escoamento e lixiviação. As erupções vulcânicas são outra fonte de emissão de As para o ambiente (ATSDR, 2007b).

A presença de As no ambiente devido a fontes antropogénicas, normalmente está associada a produtos e lixos industriais, pesticidas agrícolas, drenagem de minas, fundição de metais não ferrosos, produção de energia com recursos fósseis, e eliminação inadequada de produtos químicos que contêm As (Andrade et al., 2015; Jaishankar et al., 2014). Apesar de ser menos comum, o As e seus compostos também são libertados durante a incineração de madeiras, fumo de tabaco e na combustão de carvão (Tolins et al., 2014).

Contudo, a contaminação da água subterrânea é a principal via de exposição para muitos países (Andrade et al., 2015; Tolins et al., 2014). É estimado que 100 milhões de pessoas estão mundialmente expostas a concentrações excessivas de As via água potável. A maioria destes indivíduos obtém a sua água para consumo em fontes não regulamentadas, como é o caso de poços; e/ou vivem em regiões onde os níveis de As são muito elevados, como é o caso de alguns países asiáticos, como Bangladesh. (Tyler e Allan 2014).

Para além do consumo de água contaminada, o aumento da ingestão diária de As, também pode ser feito através da alimentação, como é o caso do consumo de marisco e pescado, que pode conter As na forma orgânica, muito menos tóxica que formas inorgânicas. Outra via de exposição é através da inalação de poeiras e fumos que contêm compostos de As (Casarett, 2013; Liang et al., 2017).

1.4.4 Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção

Estudos em animais e humanos demonstraram que o As pode ser absorvido quer pela via oral quer por inalação (Beck et al., 2017; Rodríguez et al., 2003). Cerca de 80 a 90% do As inorgânico ingerido é absorvido pelo tracto gastrointestinal; a absorção dos compostos de baixa solubilidade é menos eficiente (Casarett, 2013).

Uma vez na corrente sanguínea, o As liga-se principalmente à hemoglobina, sendo distribuído pela maioria dos tecidos; acumula-se maioritariamente em órgãos como o fígado, rins, coração, pulmão, baço, cabelo, unhas e cérebro, mas com maior incidência na hipófise (Rodríguez et al., 2003; Souza et al., 2014; Tyler e Allan 2014). Geralmente, após algumas semanas de exposição ao As aparecem umas estrias brancas transversais nas unhas, as linhas de Mees (Rodríguez et al., 2003).

Normalmente o fígado é o principal órgão onde ocorre a metilação do As inorgânico. De um modo geral, o As inorgânico, As^{5+} é reduzido enzimaticamente para As^{3+} , pela adição da S-adenosilmetionina (SAM) e de um grupo metilo. O As^{3+} é posteriormente metilado havendo formação dos ácidos monometilarsénico (MMA) e dimetilarsénico (DMA) (Rodríguez et al., 2003; Souza et al., 2014). Estas espécies de As metiladas são mais rapidamente excretadas pela urina, resultando numa menor retenção de As inorgânico nos tecidos. (Beck et al., 2017; Rodríguez et al., 2003).

Embora durante muito tempo se tenha pensado que este processo era um mecanismo de desintoxicação, estudos posteriores têm demonstrado que os metabolitos resultantes da metilação são mais tóxicos e biologicamente activos do que a forma inorgânica de As inicialmente ingerida, e como tal, a metilação pode ser considerada como um mecanismo de toxicidade deste metalóide (Beck et al., 2017; Rodríguez et al., 2003; Tyler e Allan 2014). Tem sido verificado que os indivíduos que apresentam uma maior percentagem de espécies metiladas de As inorgânico apresentam mais efeitos tóxicos relacionados com a exposição ao As (Beck et al., 2017; Rodríguez et al., 2003).

O As absorvido tem um tempo de meia vida no organismo aproximado de 10 horas, sendo 50 a 80% excretado após três dias, relativamente ao tempo de meia vida das espécies metiladas de As; este é próximo de 30 horas. A excreção do As é feita maioritariamente pela urina, podendo também ser excretado pela pele no processo de escamação, e pelo suor, particularmente em processos de transpiração intensa (Casarett, 2013).

1.4.5 Efeitos tóxicos

Uma das grandes preocupações a nível mundial relativas à exposição crónica ao As são os seus efeitos carcinogénicos (Neamtiu et al., 2016; Ng et al., 2005). A ingestão crónica de As tem sido associada ao cancro na bexiga, rins, fígado, e próstata; por outro lado, a inalação de As está relacionada com o cancro nos pulmões (Beck et al., 2017; Jochem et al., 2016; Neamtiu et al., 2016; Rodríguez et al., 2003).

Para além dos seus efeitos carcinogénicos, uma exposição crónica ao As afecta praticamente todos os órgãos e sistemas vitais do corpo humano, causando vários danos ou disfunções (Khairul et al., 2017), tais como: doenças cardiovasculares, hipertensão, *diabetes mellitus*, danos no fígado, falência renal, dermatites e diminuição da qualidade do sêmen. Para além destes efeitos, verificou-se também perturbações no sistema respiratório com diminuição da função pulmonar, e a nível imunológico com observação de interferências na resposta inflamatória e na sinalização do sistema imunitário; efeitos hematológicos e vários efeitos neurológicos incluindo a neuropatia periférica, têm de ser realçados (Das et al., 2016; Jochem et al., 2016; Khairul et al., 2017; Ng et al., 2005).

- **Efeitos neurológicos**

Numerosos estudos indicam que o As interage com o sistema nervoso a vários níveis (Rodríguez et al., 2003). Apesar da escassez de dados relativos aos efeitos da exposição aguda a As em humanos, em vários estudos foram observados sintomas como: dores de cabeça, delírio, encefalopatia, problemas de memória, dificuldades de concentração, confusão mental e ansiedade (Rodríguez et al., 2003; Tyler e Allan 2014; Vahidnia et al., 2007).

A manifestação neurológica mais frequente, em pessoas cronicamente expostas a As, é a neuropatia periférica, verificando-se uma diminuição da velocidade da condução nervosa (Vahidnia et al., 2007), que irá causar danos nas funções nervosas superiores como, linguagem, aprendizagem, coordenação motora e memória a curto e longo prazo (Tyler e Allan 2014; Vahidnia et al., 2007). Em crianças cronicamente expostas através do consumo de água contaminada foi observado que os níveis deste metalóide na urina, estão inversamente correlacionadas com a compreensão e linguagem verbal e a memória a longo prazo (Rodríguez et al., 2003). Elevadas concentrações de As podem alterar o crescimento e desenvolvimento das crianças, levando a défices neurológicos (Tyler e Allan 2014).

1.4.6 Mecanismos de toxicidade

Vários mecanismos têm sido propostos como modo de acção que explicam a toxicidade do As (Casarett, 2013). A toxicidade do As e a sua extensão dependem fundamentalmente da espécie química em causa, da taxa de absorção de cada composto de As e da afinidade dos compostos de As para as célula-alvo (Khairul et al., 2017).

Como já foi mencionado, a metilação do As^{5+} sendo um metabolismo natural do organismo, funciona também como um mecanismo de desintoxicação. Contudo, estudos posteriores demonstraram que o As^{3+} , resultado da redução do As^{5+} , é muito mais tóxico, especulando-se que este será um mecanismo de bioactivação em vez de desintoxicação (Khairul et al., 2017).

Os compostos As^{3+} são considerados mais tóxicos, pois têm uma maior taxa de acumulação nos tecidos e maior mobilidade que o As^{5+} (ATSDR, 2007b; Khairul et al., 2017). Estes mesmos compostos têm a capacidade de interagir com os grupos -SH, alterando reacções bioquímicas essenciais como a inibição dos grupos sulfidrilo de proteínas e enzimas (Rodríguez et al., 2003; Souza et al., 2014).

A elevada afinidade do As^{3+} para os grupos sulfidrilo pode também perturbar o metabolismo dos hidratos de carbono, os mecanismos de sinalização intercelular, bem como comprometer a organização do citoesqueleto da célula (ATSDR, 2007b; Neamtiu et al., 2016).

O As^{3+} pode inibir a enzima GR, diminuindo a GSH reduzida a nível celular, fundamental para a manutenção do redox celular e da protecção contra os danos oxidativos pelas ROS. (Rodríguez et al., 2003)

O stress oxidativo, devido à produção de ROS induzidas por As tem sido sugerido como o seu principal mecanismo de toxicidade (Mishra et al., 2016). Estudos em animais cronicamente expostos a

As³⁺ verificaram que o stress oxidativo no cérebro aumenta a peroxidação dos lípidos e diminuiu a actividade antioxidante das enzimas SOD e GPX. (ATSDR, 2007b ; Rodríguez et al., 2003).

Também tem sido proposto que as ROS produzidas por indução do As³⁺ danificam a membrana mitocondrial, alterando a sua permeabilidade e levando à morte da célula. Para além do stress oxidativo, o próprio As³⁺ aumenta os níveis de peróxido de hidrogénio que estão associados a danos no ADN e apoptose celular (Casarett, 2013; Rodríguez et al., 2003).

Por outro lado, o As⁵⁺ tem uma estrutura semelhante ao fosfato inorgânico e pode substituí-lo na produção da adenosina trifosfato (ATP), actuando como um desacoplador da fosforilação oxidativa. Em algumas reacções enzimáticas As⁵⁺ pode ligar-se ao local do fosfato no grupo piridoxal-fosfato, inibindo as reacções que dependam dele, como a conversão do DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) em DA (Rodríguez et al., 2003). Além destes mecanismos, outros têm sido identificados, tais como: alteração na metilação do ADN e comprometimento do seu mecanismo de reparação, instabilidade genómica e alteração nos mecanismos de regulação da proliferação celular (ATSDR, 2007b; Souza et al., 2014).

1.4.7 Estudos epidemiológicos

Os principais estudos epidemiológicos relativamente à exposição ao As, estão relacionados com a sua presença na água de consumo e as principais consequências a nível da saúde das população expostas. No estudo de Liang e col. (2017) na Tailândia, cerca de 20% da água subterrânea está contaminada, tendo valores de As muito próximos ou superiores aos 10 µg /L, valores recomendado pela OMS; mais de metade desta população usa a água proveniente dos aquíferos para consumo, encontrando-se assim em elevado risco. Como resultados deste estudo, verificou-se que existia uma relação entre o consumo da água dos aquíferos e a incidência de cancro na população, sendo fundamental assegurar planos de intervenção de forma a conseguir fornecer água para consumo não contaminada (Liang et al., 2017).

Outro aspecto preocupante relativamente à exposição ao As são os níveis do mesmo no arroz, uma vez que este é cozido em água, que poderá estar contaminada, e os grãos de arroz absorvem parte desse As. Sendo o arroz um alimento básico em numerosos países, este pode ser uma forte ameaça à saúde humana (Banerjee et al., 2013; Souza et al., 2014).

Existem outros estudos que associam a exposição do As e os seus efeitos nefastos ao nível do sistema nervoso. No trabalho de O'Bryant e col. (2011), em indivíduos expostos a As através da água contaminada, verificaram-se pontuações mais baixas nos testes neurocomportamentais, tais como linguagem, capacidades visual-espaciais e funcionamento executivo, cognição global, velocidade de processamento e memória imediata. Estes autores especulam que a correlação encontrada entre o As e o funcionamento executivo e a memória, são também manifestações da doença de Alzheimer, o que pode levar a conclusão que a exposição crónica do As, pode promover o desenvolvimento desta patologia neurodegenerativa.

Têm também sido desenvolvidos estudos em crianças, um grupo mais susceptível, havendo, no entanto, poucas evidências; há no entanto alguns estudos transversais (von Ehrenstein et al., 2007; Wang et al., 2007) que acompanharam populações de crianças dos 5 aos 15 anos e dos 8 aos 12 anos, respectivamente; os resultados dos testes neurológicos aplicados mostraram uma diminuição nos testes

intelectuais. As crianças com exposição mais elevada ao As eram as mais afectadas intelectualmente, podendo isto significar que o seu desenvolvimento poderá ser comprometido.

Para além de estudos dos efeitos da exposição ao As através do consumo de água contaminada, há outros que analisaram a exposição ao mesmo por inalação de poeiras de estrada numa cidade altamente industrializada na China, concluindo que a saúde destas crianças estava especialmente em risco; verificou-se um aumento no risco de cancro tendo em consideração a absorção do As por contacto dérmico e inalação (Sun et al., 2017).

Num estudo realizado em zonas com elevados níveis de metais, neste caso de As (Chung et al., 2016), foram avaliadas as concentrações das espécies de As na urina de residentes de cinco vilas próximas de minas de metais abandonadas na Coreia do Sul. Um dos grupos de residentes apresentou concentrações de As total e As inorgânico na urina significativamente superiores aos recomendados pela ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry); para explicar esta diferença, foi proposto o facto dos indivíduos desta vila consumirem a água proveniente dos lençóis freáticos próximos da mina abandonada (Chung et al., 2016).

1.5. Biomarcadores

Um biomarcador é um indicador, em que o seu metabolito ou o produto resultante da interacção entre este e uma determinada molécula ou célula, pode ser determinado no corpo humano (WHO, 2006). Os principais objectivos da sua utilização são avaliar a exposição (quantidade absorvida ou dose interna) e detectar os efeitos tóxicos, ainda na fase reversível, antes da instalação das alterações patológicas (Amorim, 2003; Prista e Sousa Uva, 2003). São por isso muito utilizados na avaliação dos riscos para a saúde em exposições ambientais e ocupacionais (WHO, 2001).

Os biomarcadores podem ser classificados como marcadores de exposição, efeito e susceptibilidade. Os primeiros são usados para a avaliação da exposição individual ou de uma população, estabelecendo uma ligação entre a exposição externa e a quantificação da dose interna. Por outro lado, os biomarcadores de efeito podem ser usados para documentar os efeitos adversos na saúde, estabelecendo-se assim, uma relação dose-resposta entre a exposição e os seus efeitos. Por último, os biomarcadores de susceptibilidade permitem saber o grau de resposta de cada indivíduo à exposição química, ponderando os factores genéticos ou adquiridos, assim como outros factores externos, tais como idade, alimentação, estilo de vida, entre outros; que poderão influenciar na resposta do organismo a uma determinada exposição (Amorim, 2003; WHO, 2001).

1.5.1 Biomarcadores de exposição

A utilização dos biomarcadores de exposição é cada vez mais recorrente, sendo fundamental a adequação do mesmo, ao objectivo da sua análise, assim como a escolha da matriz mais apropriada (Calafat et al., 2015).

No caso do Pb, a sua quantidade total no sangue (Pb-S), e os níveis de Pb na urina (Pb-U), são os indicadores mais utilizados na avaliação da exposição ao mesmo (Bergdahl et al., 1997; Prista e Sousa

Uva, 2003). O Pb-S é provavelmente o indicador biológico mais comum para a avaliação da exposição ocupacional e ambiental. A maioria do Pb (cerca de 98%) presente no organismo está associado às células do sangue. O Pb-S é um biomarcador de elevada fiabilidade, sendo um bom indicador da exposição recente, reflectindo os efeitos da exposição aguda ao Pb. Pode também reflectir a mobilização do Pb depositado no osso para o sangue, representando exposições passadas (Higashikawa et al., 2000; Prista e Sousa Uva, 2003; Sanders et al., 2009). O Pb-U quantifica o Pb orgânico, e é aconselhado para a monitorização continuada, especialmente para exposições ocupacionais, pois a sua colheita não é invasiva. Há estudos que referem que o Pb-U representa cerca de 10% do Pb do sangue total, sendo por isso pouco representativo (Barbosa et al., 2005; Sanders et al., 2009). Para além da determinação do Pb-S e Pb-U, também se utilizam, com menor frequência outros tecidos e fluidos biológicos, tais como o osso, dentes, soro, plasma, cabelo e unhas (Sanders et al., 2009).

Apesar de já estarem confirmados os efeitos nefastos da exposição excessiva ao Mn, ainda não existe consenso sobre qual o melhor biomarcador de exposição (Liang et al., 2016; Nascimento et al., 2016). Contudo, a maioria dos estudos epidemiológicos em populações expostas a Mn utilizam como indicadores de exposição os níveis de Mn no sangue (Mn-S) e na urina (Mn-U) (Santamaria, 2008). As concentrações de Mn-S reflectem uma exposição recente, pois devido à curta meia vida do Mn no organismo, os seus níveis decrescem abruptamente umas semanas depois da exposição, entre 10 a 42 dias (Liang et al., 2016; Santamaria, 2008). Os níveis de Mn-U representam apenas 1% da dose absorvida e cerca de 6% do total da quantidade excretada, sendo a excreção biliar a principal via de excreção, fazendo com que este biomarcador seja pouco significativo (Santos et al., 2014). Reflecte exposições recentes, uma vez que a meia vida do Mn-U é menos de 30 horas. Para além do sangue e da urina, o Mn pode ser quantificado directamente no soro, fluido cérebroespinal, fezes ou cabelo (Santamaria, 2008).

Diversos biomarcadores de exposição foram identificados e utilizados em estudos epidemiológicos de exposição ao As. O As e os seus metabolitos são geralmente quantificados no sangue, urina, cabelo e unhas (Marchiset-Ferlay et al., 2011). A análise do As no sangue (As-S) não é muito comum como indicador de exposição, mas é considerada eficaz quando se trata de exposições a elevados níveis de As. A quantificação do As-S reflecte uma exposição recente, uma vez que a maioria do As inorgânico e orgânico tem uma curta meia vida, sendo rapidamente eliminado do sangue através dos rins (Hall et al., 2006; Marchiset-Ferlay et al., 2011; NRC, 1999). A concentração de As na urina (As-U) tem sido frequentemente utilizada como indicador de exposição recente; a sua colheita não é invasiva e para além disso a urina é a principal via de excreção da maioria das espécies deste metalóide. Contudo, o As-U é o reflexo da excreção das espécies de As e não da carga actual dos tecidos (Chung et al., 2016; Hall et al., 2006; NRC, 1999). Como já foi mencionado anteriormente, as unhas e o cabelo também são duas matrizes muito utilizadas para a avaliação da exposição a As, uma vez que este tem uma grande afinidade para os grupos sulfidrilo presentes na queratina. Sendo tecidos de crescimento lento, são considerados biomarcadores de exposições mais antigas (Hall et al., 2006).

1.5.2 Biomarcadores de efeito

Os efeitos nos processos bioquímicos, que geralmente ainda são reversíveis, provocados pela substância exógena, neste caso os metais, podem ser utilizados como biomarcadores de efeito. De um modo geral, os produtos químicos após absorção, ao serem activados biologicamente irão provocar os

seus primeiros efeitos, podendo ligar-se às macromoléculas funcionais das células e tecidos alvo, tais como: as enzimas, receptores e ADN (Sakai, 2000). Assim, sabe-se que o sistema hematológico é um importante alvo da acção tóxica dos metais, afectando a síntese do heme, bem como o metabolismo das porfirinas. O sistema colinérgico também constitui um alvo da acção tóxica de alguns metais, através da inibição da actividade da acetilcolinesterase (AChE) (Ng et al., 2005; Tyler e Allan 2014). Justificamos deste modo os biomarcadores de efeito seleccionados para este trabalho.

1.5.2.1 Os metais e as alterações na síntese do heme

A síntese do heme desempenha um papel fundamental em todas as células nucleadas (Ng et al., 2005). O heme é necessário para vários processos de síntese, como por exemplo a síntese da hemoglobina pelas células eritróides e a síntese de várias hemoproteínas no fígado. Para além disso, o heme actua como cofactor de várias enzimas incluindo a peroxidase, CAT e um grande grupo de enzimas do citocromo P450, que necessitam do heme como grupo prostético (Heinemann et al., 2008; Ng et al., 2005). De um modo geral, a perturbação da síntese do heme é caracterizada pela excessiva acumulação e excreção de ALA e porfirinas (Andrade et al., 2013; Andrade et al., 2015).

O ácido δ -aminolevulínico (ALA) é sintetizado a partir da succinil CoA e glicina pela acção do ALA-sintetase (ALAS). Consequentemente o porfobilogénio é biosintetizado a partir do ALA pela acção do ALAD (Fig. 1.1). A exposição ao Pb por um lado aumenta a actividade do ALAS, aumentando a produção do ALA, e por outro inibe a actividade do ALAD que irá aumentar os níveis de ALA no sangue e consequentemente o aumento da sua excreção urinária (ALA-U) (Makino et al., 2000; Prista e Sousa Uva, 2003). Tem sido demonstrado em diversos estudos, que o aumento das concentrações de Pb-S induz um aumento substancial da excreção de ALA-U. Este ALA-U excretado está associado à quantidade de Pb metabolicamente activo no organismo (Chiba et al., 1996; Higashikawa et al., 2000; Makino et al., 2000).

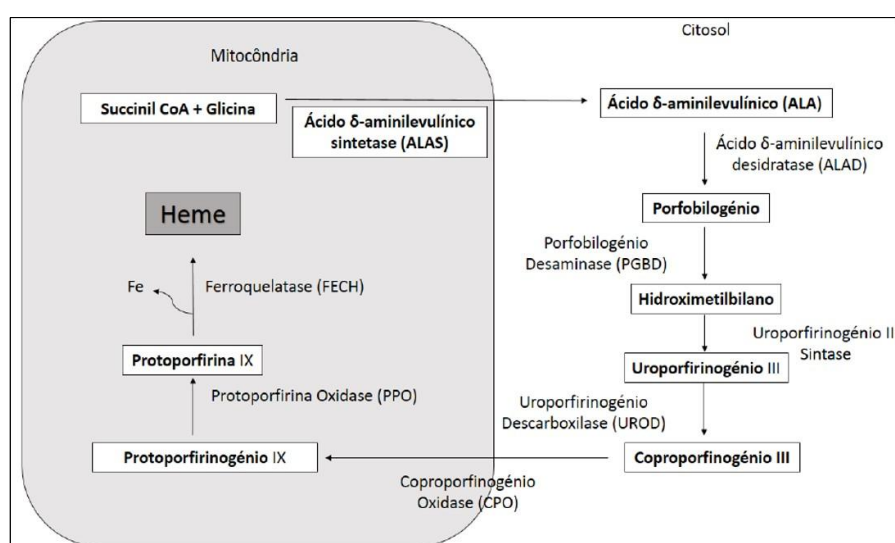


Figura 1.1 – Esquema da biossíntese do grupo heme. (Imagem adaptada de Ajioka et al., 2006)

Quanto o Mn também pode prejudicar enzimas ligadas à síntese do heme, inibindo a ALAD no fígado e nos eritrócitos, aumentando assim os níveis de ALA no sangue e consequentemente o ALA-U (Nascimento et al., 2016; Ng et al., 2005).

Quando a síntese do heme é alterada pela acção de alguns metais, para além do ALA, as porfirinas também poderão sofrer alterações. Devido à perturbação desta via metabólica os precursores das porfirinas serão acumulados e posteriormente excretados pela urina (Sakai, 2000). Em vários estudos verifica-se que o Pb e o As têm influência nas porfirinas (Ng et al., 2005). Por exemplo, no estudo com um grupo de artesãos da Nigéria, expostos ocupacionalmente a Pb, verificou-se uma diminuição estatisticamente significativa de ALAD e um aumento das protoporfirinas nos eritrócitos, que se correlacionavam com o Pb-S (Ademuyiwa et al., 2005). Por outro lado, há também estudos que relacionam o aumento das porfirinas urinárias com o aumento das concentrações de As-U (Marchiset-Ferlay et al., 2011).

1.5.2.2 Os metais e as alterações no sistema colinérgico

Os efeitos tóxicos de alguns agentes químicos, nomeadamente alguns metais, passam pela inibição da actividade da AChE. Esta enzima, é responsável pela rápida inactivação do neurotransmissor ACh, que tem um papel importante na regulação da neurotransmissão do sistema colinérgico. Este está associado a funções como a coordenação motora, locomoção e a uma série de funções cognitivas, incluindo memória, atenção selectiva e processamento emocional (AasP, 1988; Jackson, 2011; Tyler e Allan 2014).

Apesar de este sistema colinérgico não ser dos mais estudados, as suas funções podem também ser alteradas após a exposição aos três metais em estudo (Andrade et al., 2015). Sendo proposto que a sua disfunção pode estar envolvida nas alterações provocadas pela exposição por Pb, foram observados por Reddy (2003) os efeitos inibitórios de Pb na actividade da AChE. Relativamente ao Mn, e após um longo período de exposição, verificou-se um decréscimo da actividade da AChE que pode estar relacionado com o aumento de stress oxidativo (Finkelstein et al., 2007; Santos et al., 2012). Do mesmo modo, outros estudos verificaram que a exposição ao As em roedores provocou um decréscimo na actividade da AChE, observando-se um défice a nível neurocomportamental quer em humanos quer em animais (Rodríguez et al., 2003; Tolins et al., 2014; Tyler e Allan 2014).

CAPÍTULO 2 – OBJECTIVOS

Do ponto de vista ambiental e da saúde, o desenvolvimento geográfico tem uma influência crítica na qualidade da saúde humana e no meio ambiente. Inúmeras actividades do nosso quotidiano libertam uma grande variedade de químicos com propriedades tóxicas ou potencialmente tóxicas para o ambiente. Uma das preocupações relacionadas com a saúde humana e o ambiente, está normalmente associada à excessiva exposição a metais que podem causar efeitos tóxicos em organismos biológicos (Wong et al. 2006).

Devido às dificuldades com que nos deparamos em considerar os valores de metais como “normais” nos fluidos biológicos no ser humano, encontrando habitualmente diferentes valores nas concentrações de metais observados mesmo em populações não ocupacionalmente expostas em diferentes zonas do globo, mas também no mesmo país.

O nosso objectivo fundamental foi avaliar a exposição a metais em populações que vivem em diferentes zonas de Portugal, populações estas não ocupacionalmente expostas. Os valores encontrados reflectirão, no que respeita à exposição a metais, a qualidade do ambiente onde essas populações habitam ou se movimentam, e se está mais ou menos poluído com os metais em estudo, o Pb, As e Mn. Para além de nos informar sobre a possível contaminação ambiental com os referidos metais, os resultados permitirão igualmente servir de termo de comparação, ou seja, de população referência, em estudos de exposição ocupacional a metais.

Assim este trabalho teve como objectivos:

- a) Estudar a exposição a uma mistura de três metais, Pb, As e Mn, em populações não ocupacionalmente expostas;
- b) Avaliar alterações bioquímicas induzidas pela exposição a estes metais ao nível de alguns parâmetros como a acetilcolinesterase e metabolitos da biossíntese do heme, nas mesmas populações;
- c) Correlacionar as alterações encontradas com a exposição aos referidos metais.

Com o propósito de atingir estes objectivos foram realizadas as seguintes determinações:

- 1) Doseamento do Pb, Mn e As em amostras de sangue e urina das populações seleccionadas;
- 2) Determinação da AChE no sangue como biomarcador de efeito;
- 3) Determinação das porfirinas e do ALA na urina como marcadores de alterações na síntese de heme;
- 4) Correlação entre os biomarcadores de exposição e os de efeito.

CAPÍTULO 3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Amostras - caracterização

Para o presente estudo foram analisadas 63 amostras de sangue e 76 amostras de urina de populações geograficamente distintas no território nacional, não ocupacionalmente expostas a metais. No caso das amostras de urina, foram recolhidas em quatro zonas urbanas diferentes: numa região insular (Ax), numa cidade não industrial próximo de um parque natural (Sx), numa cidade com intenso tráfego rodoviário e aéreo (Lx) e por fim numa cidade em zona industrializada (Vx); relativamente às amostras de sangue apenas foram obtidas das populações Lx e Vx.

Com a intenção de reorganizar e para facilitar o posterior tratamento estatístico, a amostra além da divisão por tipologia (sangue e urina) foi também dividida em dois grandes grupos, designados por A e B. No grupo A constam todas as amostras de forma aleatória apenas interessando a sua região de origem. No grupo B, para além de organizar as amostras segundo a sua localização, houve a preocupação de utilizar unicamente as amostras em que havia uma correspondência entre as amostras de sangue e urina.

Logo após colheita das amostras nos diversos laboratórios de cada zona, as amostras foram transportadas numa mala térmica até ao laboratório de Toxicologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. Em seguida foram codificadas, colocadas numa base de dados e armazenadas a uma temperatura de -20°C , de forma a evitar perda ou alteração dos analitos. Quanto à prioridade das análises a realizar, a análise da actividade da AChE no sangue e a quantificação das porfirinas na urina, eram as análises preferenciais para evitar a degradação destes analitos.

3.1.2 Reagentes

Os principais reagentes utilizados foram: Ethyl acetoacetate ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_3$) $\geq 98\%$ Merck; manganese standard for AAS, Fluka Analytical 1000 mg/L ± 4 mg/L c (HNO_3) = 2% W/W; ethanol absolut p.a. Merck ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$), purity (GC) $\geq 99\%$; ethyl acetate 99,98 % assay (GC) ($\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$), Fisher Chemical; triton X-1000, Sigma-Aldrich; nitric acid $\geq 65\%$, Sigma-Aldrich (HNO_3); diethyl ether $\geq 99,8\%$ ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}$), Sigma-Aldrich; nitric acid trace metal grade (HNO_3) 67-69% assay, Fisher Chemical; hydrochloric acid 36,5-38% ACS Basic (HCl), Scharlau; acetic acid glacial 99,7 % (CH_3COOH), Panreac; hydrogen peroxide 100 volumes > 30 % W/V (H_2O_2), Fisher chemical; acetylthiocholine iodide ($\text{C}_7\text{H}_{16}\text{INOS}$), Sigma $\geq 98\%$; 5-aminolevulinic acid hydrochloride $\sim 98\%$ ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_3\cdot\text{HCl}$), Sigma; ethopropazine hydrochloride $\geq 98\%$ ($\text{C}_{19}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{S} \cdot \text{HCl}$), Sigma-Aldrich; Ehrlich Modificado (CH_3COOH ; 4-Dimethylaminobenzaldehyde; HClO_4); MRC TM 24,3 (Environment Canada analytical reference material); 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) $\geq 98\%$, bioreagent, Sigma ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$).

3.1.3 Descontaminação do material

Com o objectivo de minimizar possíveis contaminações, todo o material utilizado nas técnicas de GFAAS e de HGAAS foi sujeito a um tratamento prévio de descontaminação. Assim, o material esteve imerso em solução de HNO_3 ($\geq 65\%$) a 15% durante 24 horas. Após esse tempo, a solução foi retirada e o material passado novamente com solução de HNO_3 ($\geq 65\%$) a 15%, assegurando que todos os possíveis resíduos foram removidos; por último, todo o material foi lavado duas vezes com água destilada, seguido de água desionizada por duas vezes.

Relativamente ao processo de descontaminação dos vasos utilizados na digestão das amostras biológicas, foram pipetados para o vaso 3 ml de HNO_3 ($\geq 65\%$), foi dado um pulso no microondas a uma potência de 600 watts durante 30 segundos, seguido de um período de 2 horas e 30 minutos de repouso. Após esse tempo, os vasos são abertos, toda a solução é retirada do interior, e foram posteriormente lavados duas vezes com água destilada e duas vezes com água desionizada.

3.2 Métodos de análise

Os métodos analíticos de elementos vestigiais e seus sub-produtos em fluidos e tecidos biológicos tem como principais objectivos: a determinação da sua concentração e distribuição no organismo; detecção e localização dos potenciais metais tóxicos; diagnóstico de um estado de carência e identificação de possíveis efeitos relacionadas com estes elementos (Tomokuni e Ogata, 1972).

3.2.1 Quantificação de metais no sangue e urina por espectrofotometria de absorção atômica

As quatro técnicas mais utilizadas para a análise de elementos em material biológico humano são a espectrofotometria de absorção atômica com chama (FAAS) e com câmara de grafite (GFAAS), assim como, a espectrofotometria de emissão atômica com plasma de indução acoplado (ICP-AES) e a espectrofotometria de massa com plasma de indução acoplado (ICP-MS). Enquanto que os elementos mais voláteis são frequentemente analisados pela técnica de geração de hidretos (HGAAS) (Bolann et al., 2007).

Neste trabalho, metais pesados como o Mn e o Pb foram detectados e quantificados em matrizes biológicas, através da espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite. No caso do As, devido à sua volatilidade, a técnica utilizada foi a absorção atômica com geração de hidretos. O aparelho utilizado para estas análises foi o modelo PerkinElmer, AAnalyst-700.

Qualquer método de espectrometria é iniciado com a atomização, um processo em que a amostra é volatilizada e decomposta em átomos livres. Os métodos de espectrofotometria de absorção atômica são utilizados para a determinação qualitativa e quantitativa de mais de 70 elementos (Skoog et al., 2014).

No processo da absorção atômica com câmara de grafite, é emitido um determinado feixe de luz, com o comprimento de onda característico do elemento que se pretende analisar. Ao atravessar a nuvem atômica da amostra, os átomos do analito presentes absorvem esta radiação, passando ao estado

excitado. A capacidade que estes átomos têm de absorver esta radiação é medida e usada para determinar a concentração do elemento na amostra em estudo, segundo a lei de Lambert-Beer (Beaty e Kerber, 1993; Skoog et al., 2014).

Quanto à espectrofotometria de absorção atômica com geração de hidretos, a principal diferença está no processo da volatilização. A amostra, num sistema externo, reage com um agente redutor, usualmente borohidreto de sódio, resultando desta redução os hidretos covalentes voláteis que são conduzidos até à célula de amostragem (Beaty e Kerber, 1993; Bolann et al., 2007). No processo de atomização, o analito é separado da amostra pela geração de espécies gasosas. A absorção da radiação varia à medida que são criados os átomos livres e absorvem a energia do elemento a analisar (Beaty e Kerber, 1993).

Apesar de terem sido utilizadas estas duas técnicas neste trabalho, e como já foi mencionado anteriormente, as técnicas de espectrofotometria de emissão atômica com plasma de indução acoplado e de espectrofotometria de massa com plasma de indução acoplado também são comumente utilizadas uma vez que o seu limite de detecção é muito baixo, a sua leitura é rápida, e permite analisar vários elementos em simultâneo, contudo são técnicas de muito elevado custo e requerem uma maior perícia para a sua execução (Bolann et al., 2007).

3.2.1.1 Preparação das amostras

As amostras antes de serem analisadas por espectrofotometria de absorção atômica têm que passar por um processo de pré-tratamento, sendo submetidas a uma digestão ácida. Esta digestão consiste na adição de ácidos fortes e concentrados, de forma a eliminar toda a matéria orgânica que constitui a matriz da amostra.

Existem várias técnicas para realização da digestão. Neste trabalho, foi utilizada a digestão com vasos fechados para a digestão do sangue, e a digestão húmida em vaso aberto para a amostra de urina.

Para a digestão da amostra de sangue, foram utilizados recipientes de teflon fechados (*Park Microwave Acid Digestion Vessels*) tendo sido a digestão realizada posteriormente com recurso a microondas. Assim, iniciou-se o processo pesando cerca de 100 mg de sangue para o vaso, seguido de 400 µL de peróxido de hidrogénio e 2,5 ml de ácido nítrico (67-69%); os vasos foram posteriormente fechados e deixou-se a repousar durante 24 horas.

Ao terminar este tempo, utilizou-se o microondas, para fazer o primeiro pulso de radiação, submetendo o vaso a 900 watts durante 30 segundos; aguardar cerca de 2 horas e 30 minutos. Após o tempo de descanso, os vasos foram abertos cuidadosamente de forma a aliviar a pressão formada e observar a cor da amostra. Realizou-se o segundo pulso, novamente no microondas, submetendo o vaso a 600 watts durante 30 segundos, aguardando-se novamente mais 2 horas e 30 minutos.

Por último, quando terminado o tempo de repouso, foi transferido todo o volume presente no vaso para um balão volumétrico de 15 ml, perfazendo o volume com água desionizada. As amostras foram em seguida armazenadas em tubos esterilizados devidamente identificados, e conservadas a uma temperatura de 4°C para posterior análise em espectrofotometria de absorção atômica com câmara de grafite.

No que diz respeito à digestão das amostras de urina, estas foram efectuadas com recurso a digestão húmida. Iniciou-se o processo centrifugando cerca de 3 ml de urina durante 5 minutos a uma velocidade de 2000 rpm; após centrifugação da amostra, pipetou-se 2,5 ml de sobrenadante, seguido da adição de 750 µL de ácido nítrico (67-69%) e 750 µl de ácido clorídrico. Após a adição dos ácidos, a amostra foi colocada num banho a uma temperatura próxima dos 100°C durante 2 horas e 30 minutos, promovendo a digestão de toda a matéria orgânica.

No final das 2 horas e 30 minutos, a amostra foi transferida para um balão volumétrico de 15 ml, devidamente descontaminado, garantindo que o vidro não tem resíduos de metais provenientes de outras utilizações. Após a transferência da amostra para o balão, o restante volume foi ajustado com água desionizada.

Como forma de armazenamento, o conteúdo do balão foi dividido por tubos esterilizados devidamente identificados e conservados a 4°C para posterior leitura no espectrofotómetro de absorção atómica com câmara de grafite.

Para analisar o As, pela técnica de HGAAS, após a digestão das amostras e antes da leitura no espectrofotómetro de absorção atómica, realizaram-se os seguintes passos: 1) pipetou-se 1 ml da amostra, 2) adicionou-se 1ml de ácido ascórbico, 1 ml de HCL concentrado e 1 ml de iodeto de potássio, e 3) e por fim, perfez-se a solução com água desionizada num balão volumétrico e aguardou-se 45 minutos. A reacção de redução foi realizada utilizando HCl a 10% e NaBH₄ a 0,2% em NaOH a 0,05%.

Em todas as leituras efectuadas foram realizadas curvas de calibração diárias. Assim foram analisados brancos respeitando as matrizes das amostras. As concentrações utilizadas para as curvas de calibração foram as seguintes: Mn, 5, 10, 15, 20 µg de Mn/ L de água desionizada, Pb 4, 8, 20, 40, 80 µg de Pb / L de água desionizada, e As 1,25, 2,5, 5, 10, 20 µg de As/L de água desionizada.

3.2.1.2 Determinação de parâmetros da validação

Um método analítico é um processo que envolve manipulações susceptíveis de acumularem erros (sistemáticos e/ou aleatórios), podendo em algumas situações, alterar de forma significativa o valor do resultado final. Como tal, estes resultados deverão satisfazer requisitos de qualidade para serem validados (Castro et al., 2000). Assim na Tabela 3.1, encontram-se os parâmetros de validação estimados para os métodos de determinação de metais na urina e sangue.

Tabela 3.1 - Parâmetros de validação estimados para os métodos de determinação de metais.

	Limite de Detecção	Limite de Quantificação	Coefficiente de Variação de Repetibilidade	Coefficiente de Determinação (r^2)
Pb-U	2,8 µg/L	8,5 µg/L	8,00%	0,993
Mn-U	1,94 µg/L	5,89 µg/L	12,50%	0,998
As-U	0,55 µg/L	1,69 µg/L		1,000
Pb-S	10,54 µg/L	31,94 µg/L	6,65%	0,996
Mn-S	1,16 µg/L	3,50 µg/L	8,96%	0,998
As-S	0,55 µg/L	1,69 µg/L		1,000

Utilizando-se Materiais de Referência Certificados com concentrações de Pb de $5,82 \pm 0,45$ µg/L e Mn de $8,12 \pm 0,72$ µg/L, determinou-se também a exactidão de Pb e Mn, sendo estas 5,29 µg/L e 10,64 µg/L, para cada um dos metais respectivamente.

3.2.2 Quantificação dos biomarcadores de efeito

Os métodos de medida baseados na utilização de radiação electromagnética são muito utilizados e baseiam-se na medição da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas espécies moleculares ou atómicas analisadas. Estes métodos são classificados de acordo com a região do espectro electromagnético em utilização, neste caso na região da luz visível, utilizando comprimentos de onda na gama dos 370 - 750 nm (Skoog et al., 2014).

3.2.2.1 Determinação das Porfirinas na urina

Após as amostras estarem à temperatura ambiente, para a determinação de porfirinas na urina pipetou-se 750 µL de urina para um *ependorf* e centrifugou-se durante cerca de 5 minutos a uma velocidade de 2000 rpm. Após a centrifugação retiraram-se 500 µL de sobrenadante.

Ao volume pipetado adicionou-se 50 µL ácido acético glacial e agitou-se; a esta solução adicionou-se 1250 µL éter dietílico, e agitou-se no vortex cerca de 15 segundos, sendo posteriormente centrifugado durante 3 minutos a 2500 rpm para separação de fases.

Após a centrifugação foi visível a formação de duas fases distintas, a orgânica e a aquosa. Em seguida, transferiu-se a fase superior, a orgânica, para outro *ependorf*, desprezando a fase aquosa.

À fase orgânica foi adicionado 1250 µL de solução clorídrica de iodo, agitou-se no vortex e centrifugou-se a amostra. Há novamente formação de duas fases distintas, recuperando-se desta vez a fase aquosa, a inferior, e eliminando a fase orgânica.

Após esta segunda separação de fases, a amostra foi submetida a um banho a uma temperatura de 37°C durante 5 minutos.

Por fim, num espectrofotômetro de radiação visível, utilizando como branco uma solução de HCl a 5%, leu-se a absorvência da amostra nos comprimentos de onda: 380, 430 e 401 nm (Soulsby e Smith, 1974).

Para a obtenção da concentração das porfirinas ($\mu\text{g/L}$), tendo em conta os valores obtidos para cada amostra nos três comprimentos de onda, aplicou-se a seguinte fórmula (Expressão 3.1) referenciada no método de Soulsby e Smith (1974):

$$[2 \times A_{401} - (A_{430} + A_{380})] \times 2,093 \times 1,064 \times 1000 = \chi \mu\text{g/L}$$

Expressão 3.1 – Expressão do cálculo das concentrações de porfirinas

3.2.2.2 Determinação de Ácido delta-aminolevulínico na urina

Para a determinação do ALA na urina através de uma determinação espectrofotométrica de radiação visível, foi realizado o seguinte procedimento: colocar as amostras de urina à temperatura ambiente e pipetar 668 μL de urina para um *eppendorf*, que foi posteriormente a centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos; após a sedimentação da amostra transferiu-se 334 μL do sobrenadante para outro *eppendorf*, desprezando a restante amostra.

Ao sobrenadante adicionou-se 334 μL de tampão acetato de pH 4,6 e 67 μL de acetoacetato de etilo. Para garantir uma boa homogeneização, agitou-se a amostra 5 segundos no vortex.

Em seguida a amostra foi colocada num banho a 100°C durante 10 minutos; após terminar o tempo retirou-se cuidadosamente a amostra, e deixou-se repousar até arrefecer. Posteriormente foi adicionado 1000 μL de acetato de etilo, seguido de agitação em vortex durante 15 segundos e centrifugação a uma velocidade de 2000 rpm durante 3 minutos, com formação de duas fases, sendo a orgânica a fase superior.

A fase orgânica foi recuperada, eliminando a aquosa. À fase orgânica adicionou-se 668 μL de reagente de Ehrlich Modificado e agitou-se no vortex de forma a garantir uma boa homogeneização; as leituras no espectrofotômetro foram feitas 10 minutos depois.

Foi necessário a preparação de padrões com concentrações conhecidas (15mg/L, 10mg/L, 5mg/L, 2,5mg/L, e 1,25mg/L) para a elaboração de uma curva de calibração. A preparação destes padrões foi feita após diluição de uma solução-padrão com uma concentração 50 mg/L.

A leitura das absorvências das amostras e padrões foi realizada no espectrofotômetro, no comprimento de onda de 553 nm contra um branco de reagente. A análise quantitativa do ALA é calculada através da equação da recta ($y=m\chi+b$) obtida após a realização da curva de calibração (Tomokuni e Ogata, 1972).

Os parâmetros de validação determinados para este método foram o limite de detecção e quantificação, tendo-se obtido os valores de 0,016 mg/L e 0,047 mg/L, respectivamente. O estudo da linearidade levou à obtenção de um coeficiente de determinação de 0,996.

3.2.2.3 Determinação da Creatinina na urina

De um modo geral, a quantificação dos biomarcadores urinários, quer de exposição quer de efeito, representam os seus níveis no organismo. Estes são obtidos através do volume total da urina, normalmente num período de 24 horas. No entanto, a colheita completa da urina de 24 horas pode ser difícil de conseguir, sendo pouco prático e pouco fiável para os indivíduos do ensaio em estudo. Assim, uma alternativa é recolher amostras correspondentes ao volume de uma micção e corrigir a quantificação do biomarcador com uma medida de diurese, por exemplo a creatinina (Garde et al., 2003).

A correcção da creatinina deve ser feita de forma a ajustar os valores das concentrações dos biomarcadores analisados na urina, uma vez, que estes dependem de variações individuais como: idade, sexo, estado de hidratação, hábitos e estilo de vida (alimentação, exercício físico, tabaco, drogas e álcool), massa corporal, taxa de filtração glomerular e o tempo decorrido desde a última micção (Boeniger et al. 1993).

A creatinina é um subproduto da actividade muscular, sendo eliminada da corrente sanguínea pelos rins e excretada na urina. Sendo a excreção diária da creatinina na urina bastante consistente, e sabendo-se que as concentrações do analito apresentam uma proporção com a concentração da creatinina, a medição da creatinina na urina tornou-se um método comum na correcção das concentrações de analitos (Miller et al., 2004).

Deste modo, todos os valores obtidos dos marcadores determinados na urina, quer por espectrofotometria de absorção atómica quer por radiação visível foram corrigidos com os valores de creatinina das respectivas urinas. A concentração de creatinina nas amostras de urina foi calculada através da utilização do kit Randox Creatinine (Crea).

3.2.2.4 Determinação da actividade da Acetilcolinesterase no sangue

Para o cálculo da actividade da enzima AChE no sangue, procedeu-se à pesagem de 50 mg de sangue para um *ependorf*; adicionou-se 900 µL de tampão fosfato com um pH de 7,4 e 100 µL de Triton. Esta mistura foi designada de homogenato.

Noutro *ependorf* pipetou-se 500 µL de tampão fosfato (pH 7,4), 250 µL do homogenato preparado anteriormente, 25 µL de DTNB e 2,5 µL de etopropazina; aguardou-se 10 minutos.

Após os 10 minutos, na *cuvette* que será utilizada no espectrofotómetro, foram colocados 200 µL da solução preparada, 1000 µL de tampão fosfato com pH 7,4 e 12,5 µL de ACh. A solução foi agitada para garantir uma boa homogeneização e leu-se de imediato no espectrofotómetro, que já estava previamente programado para leituras no comprimento de onda de 436 nm, fazendo uma leitura contínua durante 3 minutos, e fazendo o registo da absorvência de 10 em 10 segundos.

Para esta leitura utilizou-se como branco a seguinte solução: 750 µL de tampão fosfato com pH 7,4, 25 µL de DTNB e 25 µL de etopropazina. O método utilizado para esta análise foi o de Ellman modificado, tendo-se determinado o coeficiente de variação de repetibilidade que foi de 13,60% (Ellman et al., 1961).

Para obter o valor da actividade da AChE ($\mu\text{mol AChE/min/g}$) é utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{AChE } (\mu\text{mol AChE/min/g}) = (\text{média } \Delta \times 0,0015) / (0,0136 \times \text{peso corrigido (g)})$$

$$\text{Em que o peso corrigido } \acute{e} = (\text{sangue pesado (g)} \times 25) / 2000$$

E o Δ é o somatório das diferenças entre a absorvências ($\text{abs } t_n - \text{abs } t_{n-1}$, sendo $t = \text{tempo}$).

Expressão 3.2 – Expressão do cálculo da actividade da AChE

3.3 Tratamento estatístico

A análise estatística foi realizada usando os programas Microsoft Office Excel 2016 e SPSS STATISTICS, versão 17.0. Os resultados são expressos como média \pm SD. Após verificação da normalidade dos dados obtidos através do teste de Kolmogorov-Smirnov e da homogeneidade das variâncias com teste de Levene, optou-se pela aplicação de testes de Mann-Whitney, para a comparação dos diferentes grupos em estudo relativamente aos níveis de cada biomarcador. Por fim, foram realizadas análises discriminantes utilizando os diversos biomarcadores, no sentido de averiguar quais os biomarcadores que isoladamente ou em conjunto apresentavam melhor desempenho na previsão correcta do grupo ao qual pertence cada indivíduo em estudo. Efectivamente, esta técnica de análise estatística multivariada é utilizada para identificar variáveis que discriminam grupos. A primeira etapa desta análise passa pela discriminação das características (no caso deste trabalho, os biomarcadores) que podem ser capazes de colocar objectos (neste caso, os indivíduos) nos grupos previamente definidos (A_x , S_x , L_x , e V_x). Desta forma, permite prever numa situação nova qual o grupo mais adequado, que deverá pertencer um determinado indivíduo, segundo as suas características (Johnson e Wichern, 1999). O limite de significância estatística estabelecido foi de $p < 0,05$ (nível de significância de 95%).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS

4.1 Determinação de biomarcadores em amostras de urina e sangue

4.1.1 Determinação do Pb, Mn e As em amostras de urina no grupo A

Nas Fig. 4.1, 4.2 e 4.3, podemos observar os níveis de Pb, Mn e As nas amostras de urina que foram categorizadas como grupo A, isto é, as amostras que apenas foram divididas tendo em conta a sua origem geográfica.

Relativamente aos níveis de Pb nas quatro populações analisadas (Fig. 4.1), verifica-se que os níveis mais elevados são os das zonas Vx e Lx, destacando-se Vx que é a população com as concentrações mais elevadas, sendo estatisticamente diferente de Ax e Sx. Por outro lado, a população com níveis mais baixos foi a Sx.

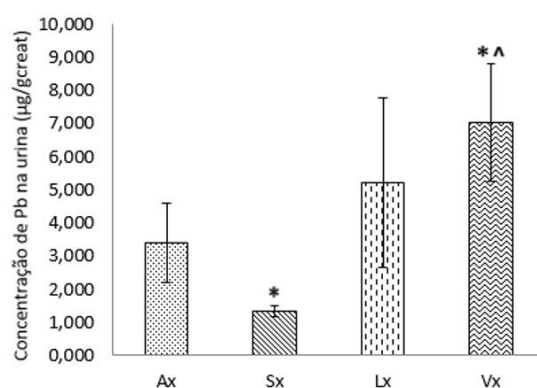


Figura 4.1 - Níveis de Pb na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em amostras de populações Ax, Sx, Lx e Vx. N = 16, 7, 25 e 23, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: * e ^ são $p < 0,05$ vs Ax e Sx, respectivamente.

Quanto às concentrações de Mn na urina (Fig. 4.2), podemos referir que os grupos Vx e Ax apresentam as concentrações mais elevadas, sendo semelhantes entre si. As concentrações observadas no grupo Vx são assim superiores e significativamente diferentes ($p < 0,05$) das populações Sx e Lx. Quanto às concentrações mais baixas foram verificadas em Lx.

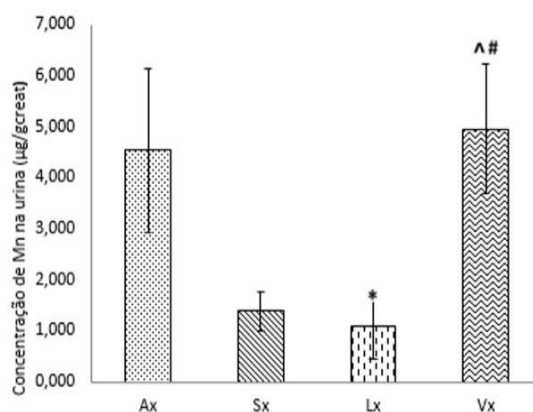


Figura 4.2 - Níveis de Mn na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em amostras de populações Ax, Sx, Lx e Vx. N = 16, 7, 26 e 23, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: *, ^ e # são $p < 0,05$ vs Ax, Sx e Lx, respectivamente.

No que diz respeito aos níveis de As na urina das várias populações em estudo, foi observado que o grupo Lx apresentou as concentrações mais elevadas e significativamente diferentes ($p < 0,05$) de Ax, Sx e Vx. Por outro lado, na população de Sx foram observados os níveis de As mais baixos, sendo estatisticamente diferente ($p < 0,05$) de Ax e de Lx (Fig. 4.3).

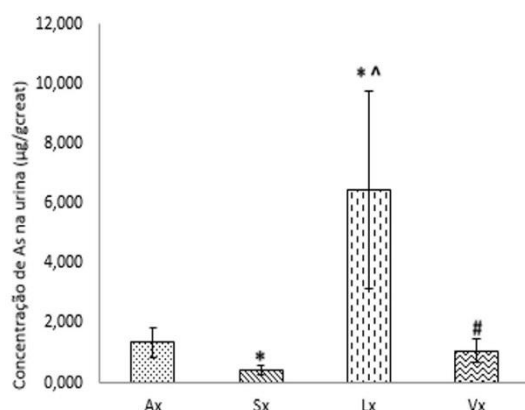


Figura 4.3 - Níveis de As na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em amostras de populações Ax, Sx, Lx e Vx. N = 16, 7, 26 e 24, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: *, ^ e # são $p < 0,05$ vs Ax, Sx e Lx, respectivamente.

4.1.2 Determinação de Pb, Mn e As em amostras de sangue no grupo A

Relativamente às amostras de sangue foram unicamente analisadas as populações Lx e Vx. Nos três gráficos seguintes estão representadas as concentrações de Pb, Mn e As nas amostras de sangue do grupo A.

Quando analisadas as concentrações do Pb no sangue, a população Vx apresentou valores mais elevados e com diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente à população Lx (Fig. 4.4); quanto às concentrações de Mn no sangue a população Lx apresentou valores superiores e significativamente

diferentes de Vx (Fig. 4.5). Relativamente aos valores de As no sangue, estes foram superiores em Lx e com diferença estatística ($p<0,05$) comparativamente a Vx (Fig. 4.6).

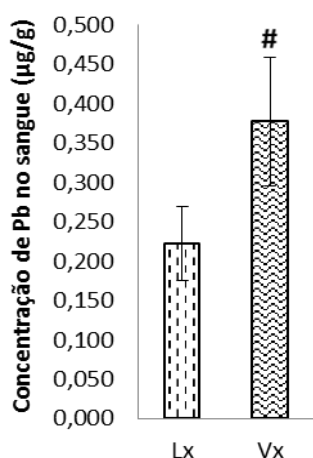


Figura 4.4 - Níveis de Pb no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 31 e 28, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p<0,05$ vs Lx.

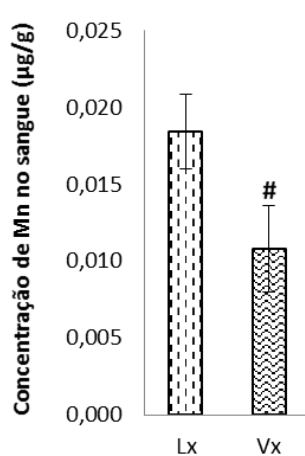


Figura 4.5 - Níveis de Mn no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 32 e 24, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p<0,05$ vs Lx.

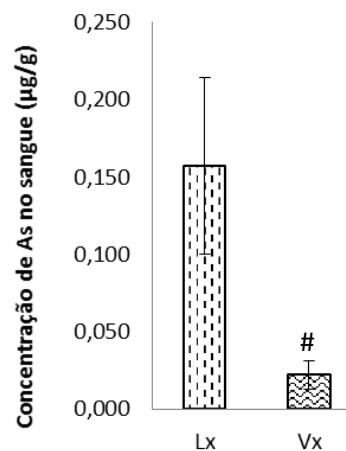


Figura 4.6 - Níveis de As no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 30 e 28, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p<0,05$ vs Lx.

4.1.3 Determinação das Porfirinas e Ácido delta- aminolevulínico na urina e Acetilcolinesterase no sangue no grupo A

Nos três gráficos que se seguem (Fig. 4.7, 4.8 e 4.9) são apresentados os resultados das concentrações dos biomarcadores de efeito, as porfirinas e o ALA na urina e a AChE no sangue das amostras do Grupo A.

No que concerne os níveis de porfirinas, todas as populações obtiveram resultados diferentes entre si e com diferenças significativas ($p<0,05$). Contudo, a população Vx foi a que teve os valores mais elevados, e a população Sx foi a que apresentou as concentrações mais baixas (Fig. 4.7).

Relativamente às concentrações de ALA na urina observou-se que das quatro populações em estudo, os níveis mais elevados foram os de Lx, que se apresentaram significativamente mais elevados ($p<0,05$) a Ax e Sx. Na população Sx verificou-se as concentrações mais baixas, sendo estatisticamente diferente de Ax ($p<0,05$). A população Vx apresentou diferenças com significado estatístico ($p<0,05$) das populações Ax e Lx. (Fig. 4.8).

Em relação à actividade da AChE não foram determinadas diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$), sendo os valores de ambas as populações semelhantes entre si (Fig.4.9).

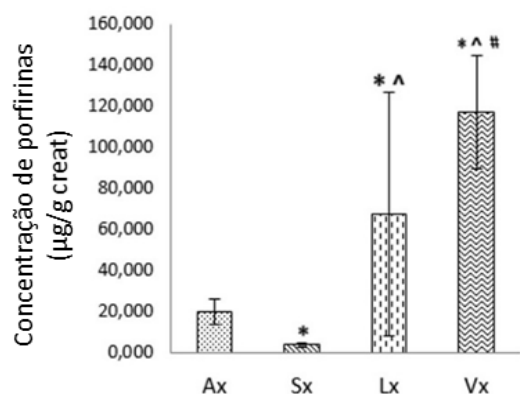


Figura 4.7 - Níveis de porfirinas na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Ax, Sx, Lx e Vx. N = 13, 6, 24 e 16, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: *, ^ e # são $p<0,05$ vs Ax, Sx e Lx, respectivamente.

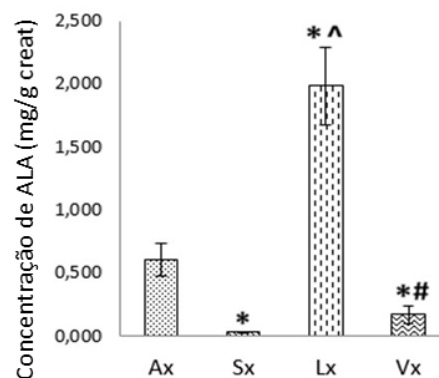


Figura 4.8 - Níveis de ALA na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Ax, Sx, Lx e Vx. N = 11, 7, 22 e 22, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: *, ^ e # são $p<0,05$ vs Ax, Sx e Lx, respectivamente.

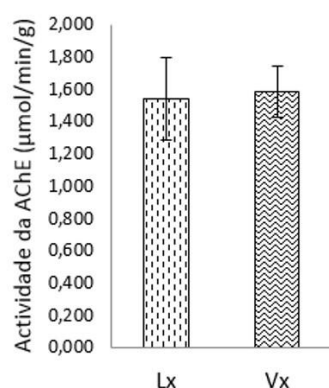


Figura 4.9 – Actividade da AChE no sangue em indivíduos das populações Lx, Vx. N = 26 e 28, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

4.1.4 Determinação do Pb, Mn e As em amostras de urina no grupo B

Nos gráficos seguintes (Fig. 4.10, 4.11 e 4.12) são apresentadas as concentrações de Pb, Mn e As na urina e no sangue, bem como os níveis dos biomarcadores de efeito (porfirinas, ALA e AChE) nas amostras do Grupo B, amostras estas que para além da organização de acordo com a origem geográfica foi possível a obtenção de urina e sangue provenientes dos mesmos indivíduos.

A concentração dos metais na urina no grupo B apresentou diferenças significativas ($p<0,05$) ao quantificar Mn e As (Fig. 4.11 e 4.12). Na quantificação dos três metais, os valores de Vx foram superiores a Lx, excepto para os níveis de As na urina (Fig. 4.12).

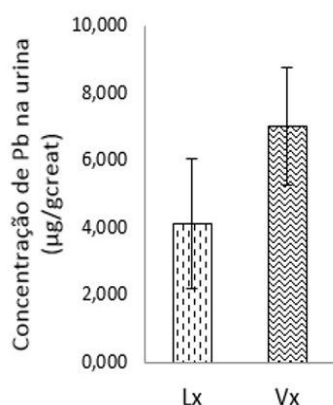


Figura 4.10 - Níveis de Pb na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 8 e 23, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

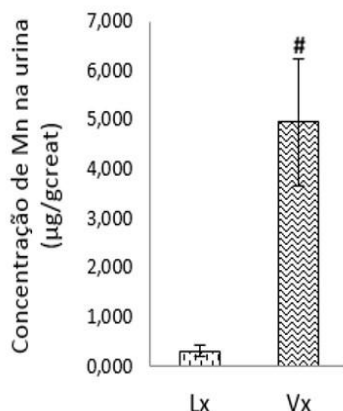


Figura 4.11 - Níveis de Mn na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 23, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

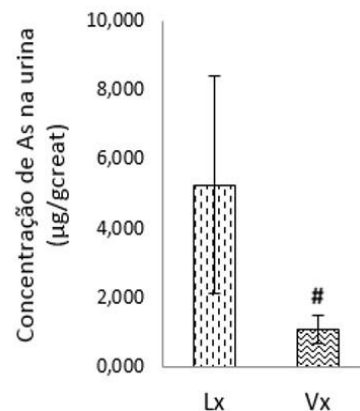


Figura 4.12 - Níveis de As na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 24, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

4.1.5 Determinação do Pb, Mn e As em amostras de sangue no grupo B

Após a determinação dos níveis dos três metais no sangue do grupo B, observou-se que a população de Vx apresentou valores de Pb e As superiores a Lx, contudo apenas é significativa a diferença no que diz respeito ao Pb ($p < 0,05$) (Fig. 4.13, 4.14 e 4.15).

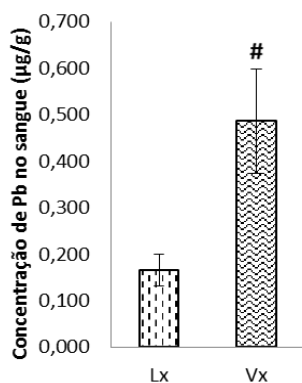


Figura 4.13 - Níveis de Pb no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 8 e 21, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p < 0,05$ vs Lx.

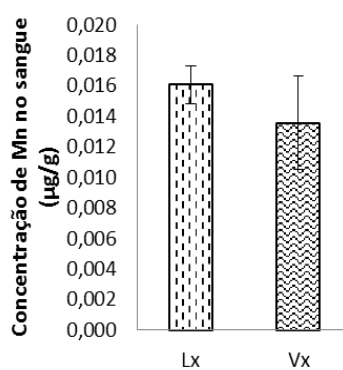


Figura 4.14 - Níveis de Mn no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 17, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

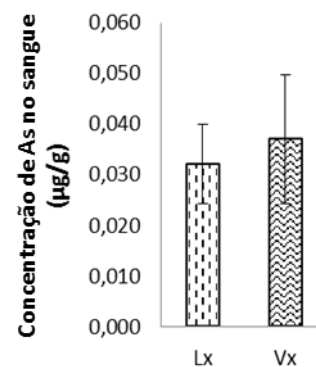


Figura 4.15 - Níveis de As no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 21, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

4.1.6 Determinação das Porfirinas e Ácido delta- aminolevulínico na urina e Acetilcolinesterase no sangue no grupo B

Na análise dos biomarcadores de efeito na urina das populações Lx e Vx, verificou-se que Vx apresentou concentrações de porfirinas significativamente ($p<0,05$) mais elevadas que as observadas em Lx (Fig. 4.16) e valores significativamente menores ($p<0,05$) de ALA (Fig. 4.16, 4.17).

Quanto à actividade da AChE no sangue os valores foram semelhantes em ambas as populações (Fig. 4.18).

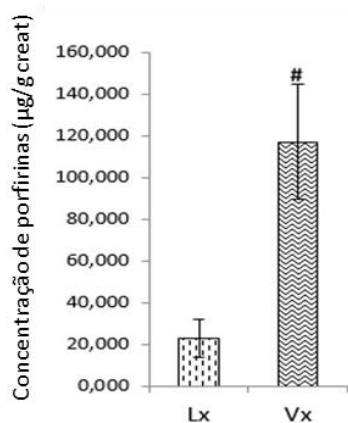


Figura 4.16 - Níveis de porfirinas na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 7 e 16, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p<0,05$ vs Lx.

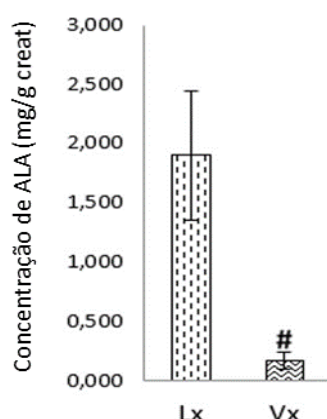


Figura 4.17 - Níveis de ALA na urina, corrigidos pela concentração de creatinina, em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 9 e 22, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney: # é $p<0,05$ vs Lx.

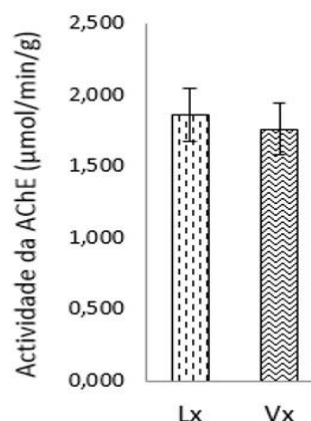


Figura 4.18 - Actividade da AChE no sangue em indivíduos das populações de Lx e Vx. N = 4 e 21, respectivamente. Os valores representam a média \pm SD. Todos os grupos foram comparados usando testes de Mann-Whitney.

4.2 Análise discriminante

No seguimento do tratamento estatístico dos resultados, fez-se uma análise discriminante para averiguar a capacidade dos biomarcadores escolhidos em discriminar correctamente cada indivíduo no seu respectivo grupo.

Numa primeira análise foram seleccionados todos os biomarcadores determinados na urina, obtendo-se os melhores resultados quando o Mn na urina foi excluído deste conjunto, como se verifica na Tabela 4.1 e na Fig. 4.19.

Ainda na Tabela 4.1, pode verificar-se que a percentagem de casos agrupados correctamente foi de 89,8%. A população que apresentou menor percentagem de indivíduos correctamente identificados foi a de Vx, com 84,6%; contrariamente, Sx foi a população em que todos os casos foram categorizados correctamente.

Tabela 4.1. A tabela representa a percentagem dos indivíduos (N=89,8%) que, após análise discriminante, foram agrupados correctamente nas populações Ax, Sx, Lx e Vx, através dos níveis de biomarcadores determinados na urina (Pb-U, As-U, porfirinas e ALA).

PREVISÃO DO GRUPO (%)					
Grupo	Ax	Sx	Lx	Vx	Total
Ax	88,9	11,1	0	0	100,0
Sx	0	100,0	0	0	100,0
Lx	9,5	0	90,5	0	100,0
Vx	7,7	7,7	0	84,6	100,0

a. 89,8% dos casos foram agrupados correctamente

A Fig. 4.19, representação gráfica da Tabela 4.1, mostra uma tendência para separação dos quatro grupos, com uma maior separação entre os grupos Vx e Lx. Contudo ao analisarmos os grupos Lx, Ax e Sx, existem algumas amostras que foram erradamente classificadas, o que é ilustrado na figura pela sobreposição dos grupos.

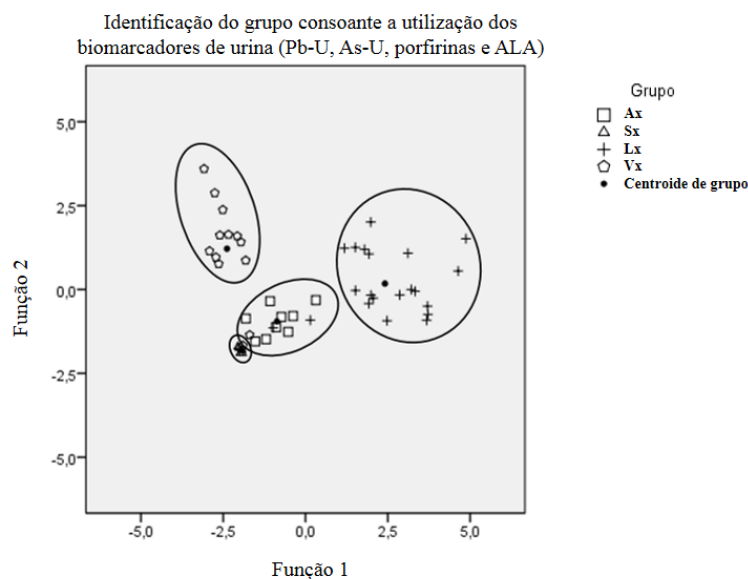


Figura 4.19 - Representação gráfica, após análise discriminante, da classificação de cada indivíduo nos grupos Ax, Sx, Lx ou Vx utilizando os biomarcadores urinários (Pb-U, As-U, porfirinas e ALA).

Quanto à segunda análise discriminante, considerou-se apenas os biomarcadores de efeito na urina como factor de categorização dos grupos, como se pode observar na Tabela 4.2 e na Fig. 4.20.

Na Tabela 4.2, a percentagem total de casos categorizados correctamente foi de 88%. Sendo que a população com o total de indivíduos bem identificadas foi a de Sx e a população com mais casos mal agrupados foi a de Ax.

Tabela 4.2 A tabela representa a percentagem dos indivíduos (N=88,0%) que, após análise discriminante, foram agrupados correctamente nas populações Ax, Sx, Lx e Vx, através dos níveis de biomarcadores de efeito na urina (porfirinas e ALA).

PREVISÃO DO GRUPO (%)					
Grupo	Ax	Sx	Lx	Vx	Total
Ax	77,8	22,2	0	0	100,0
Sx	0	100,0	0	0	100,0
Lx	9,5	0	90,5	0	100,0
Vx	7,7	14,3	0	85,7	100,0

a. 88,0% dos casos foram agrupados correctamente

Na Fig. 4.20, representação gráfica da Tabela 4.2, e utilizando os biomarcadores de efeito na urina (porfirinas e ALA), pode observar-se novamente uma separação dos quatros grupos em estudo, com um afastamento evidente entre os grupos Vx e Lx. Porém ao verificarmos os grupos Lx, Ax e Sx há diversos indivíduos que não estão categorizadas correctamente, tendo sido colocadas em grupos que não pertencem.

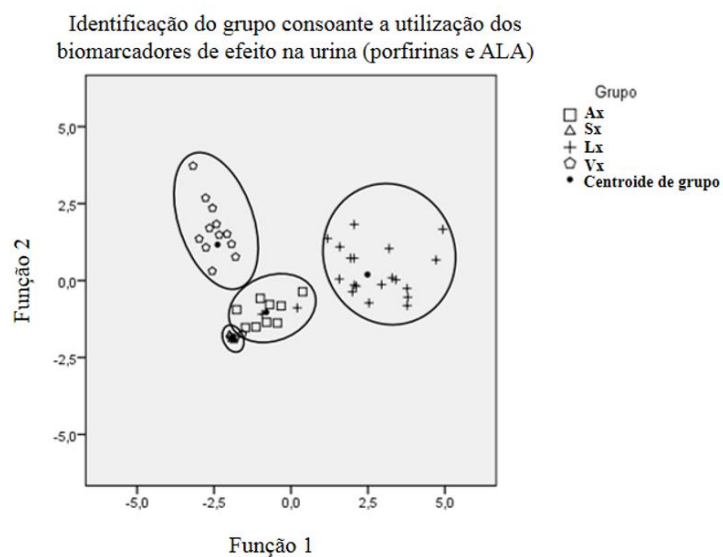


Figura 4.20. Representação gráfica após análise discriminante, da classificação de cada indivíduo nos grupos Ax, Sx, Lx ou Vx utilizando os biomarcadores de efeito na urina (Porfirinas e ALA).

CAPÍTULO 5 - DISCUSSÃO

Níveis de Pb, As e Mn na urina e no sangue

De um modo geral, no que diz respeito aos resultados obtidos nos níveis dos metais analisados na urina, Pb, As e Mn, a população da zona urbana industrializada, Vx, é a que maioritariamente apresenta os valores mais elevados (Fig. 4.1, 4.2, 4.10 e 4.11). A excepção foi o caso do As, em que a população que apresentou sempre os valores superiores foi a de Lx (Fig. 4.3 e 4.12).

No estudo de Liang e Mao (2015), foram analisadas as fontes antropogénicas de Pb que mais contribuem para a sua emissão no meio ambiente, e quais as que apresentavam maior risco para a saúde dos seres humanos. Os resultados revelaram que a gestão de resíduos que contém Pb e/ou a sua reciclagem, bem como a sua produção e fabrico são as fontes que mais contribuem para o aumento de Pb no ambiente, e também as que representam uma maior ameaça ao bem-estar e saúde das populações. Esta ocorrência poderá justificar em parte o facto da população pertencente à zona urbana industrializada Vx, apresentar sempre as concentrações médias mais elevadas de Pb, quer na urina quer no sangue relativamente ao grupo A, onde os indivíduos são analisados de forma aleatória apenas interessando a região de origem; resultados semelhantes foram observados para o grupo B, grupo que para além dos indivíduos estarem organizados segundo o local de origem, houve igualmente para cada indivíduo uma correspondência entre as amostras de sangue e urina (Fig. 4.1, 4.4, 4.10 e 4.13).

Como já foi mencionado, o Pb-S é dos indicadores mais utilizados para a biomonitorização da exposição a este metal. Contudo, as concentrações de Pb-S e principalmente na urina não são bons biomarcadores de exposições crónicas, pois devido à acumulação do Pb nos ossos, em caso de exposições continuadas, as amostras não irão reflectir essa acumulação que se dá ao longo do tempo (ATSDR, 2007a; Barbosa et al., 2005; Sanders et al., 2009). É, no entanto, possível colocar a hipótese de que os indivíduos que vivem na zona urbana industrializada estejam mais expostos a este metal, do que as restantes populações, uma vez que os valores de Pb em Vx se mostraram significativamente diferentes ($p < 0,05$) das populações de Lx e Sx (Fig. 4.1, 4.4, 4.13). Assim, de acordo com os resultados da nossa amostra, o ambiente próximo da zona industrial examinada tem um maior impacto na emissão de Pb do que as zonas urbanas em análise, uma que apresenta elevado tráfego automóvel e aéreo (Lx), e a outra próxima de um parque natural (Sx). No caso de Lx, poderemos por em hipótese o facto de o Pb já não ser utilizado como aditivo na gasolina, daí as actividades industriais terem um impacto superior.

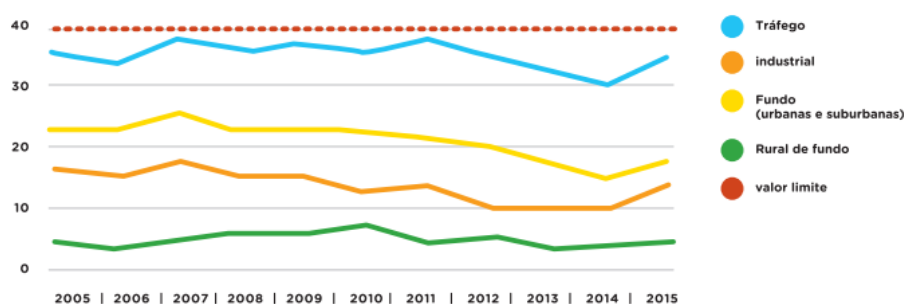
Analisando os relatórios trimestrais municipais da zona Vx, é possível verificar que não há nenhuma inconformidade nas análises da água durante o ano de 2016, podendo colocar-se a hipótese de que a principal via de exposição seja através da inalação do ar poluído devido às actividades do parque industrial existente na zona. Contudo, é de notar que apesar de os níveis médios de Pb serem superiores na população Vx não são superiores ao valor limite biológico (VLB) definido segundo a Directiva 98/24/CE para este metal que é de 70 $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ de sangue. No presente estudo o valor médio de Pb-S verificado para a população Vx foi de 22 $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$. No entanto, em diversos estudos realizados ao longo das últimas décadas, foram encontrados efeitos adversos na saúde de populações, com valores de Pb-S de 25 $\mu\text{g Pb}/100\text{ ml}$ (Tong et al., 2000). Este estudo preliminar indica que é necessário ter atenção aos valores obtidos na população Vx, e confirmar estes resultados em outros estudos.

No que diz respeito aos níveis de Mn, verificam-se duas situações distintas, por um lado, no caso do Mn-U a população Vx revelou valores médios superiores e com diferenças significativas ($p < 0,05$)

quando comparados com os da população Lx (nos grupos A e B) e Sx (no grupo A) (Fig. 4.2 e 4.11). Relativamente ao Mn-S, a população com os níveis médios mais elevados foi Lx, apresentando diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente à população Vx, apenas no grupo A (Fig. 4.5, 4.14).

Recordando que uma das principais fontes antropogénicas de Mn está associada à indústria metalúrgica, no fabrico de ligas metálicas, aço e produtos de ferro (Lucas, 2010), está em concordância com as Fig 4.2 e 4.11, pois a população de uma zona urbana industrial, Vx, é a que tem os níveis de Mn-U mais elevados ($4,95 \mu\text{g/g}$ creat para ambos os grupos A e B), estando assim estes teores Mn-U acima dos recomendados ($< 2 \mu\text{g/g}$ de creatinina) (Félix, 2007). A população de Ax, pertencente a uma zona urbana numa área insular, também apresentou níveis de Mn-U acima dos recomendados com um valor médio de $4,54 \mu\text{g/g}$ de creatinina, o que se poderá tentar justificar pelo excessivo consumo de alimentos ou água ricos em Mn, ou pelo uso excessivo de fertilizantes que contenham este metal. Contudo, sabendo que a principal via de excreção do Mn é através das fezes, o Mn-U é considerado um marcador com pouca representatividade, sendo o Mn-S mais habitualmente utilizado (Aschner et al., 2007; Zheng et al., 2010).

Ao analisar o Mn-S, considerado como sendo o melhor marcador de exposição, que reflecte em parte o Mn total presente no organismo (Aschner et al., 2007; Félix, 2007), observa-se que a população com os valores médios mais elevados foi a de Lx com níveis médios de $2 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ em ambos os grupos A e B (Fig. 4.5 e 4.14), valor superior ao estabelecido que é de $1 \mu\text{g}/100 \text{ mL}$ (Félix, 2007). Podemos assim colocar a hipótese de que a presença do MMT, aditivo da gasolina à base de Mn (comercializado em Portugal com 2 mg de Mn por litro segundo Decreto-Lei n.º 142/2010 de 31 de Dezembro) pode ter impacto na acumulação deste metal nos indivíduos residentes numa zona de maior tráfego. Alguns estudos têm sugerido que num ambiente urbano a combustão do MMT na gasolina é a principal fonte de contaminação ambiental de Mn, tendo já sido estabelecida uma correlação entre a concentração do Mn atmosférico e a densidade do tráfego (Bolté et al., 2004). No estudo de Lin e col. (2012) foi encontrada uma forte correlação entre as concentrações de NO_2 no ar e os níveis de Mn no sangue do cordão umbilical em gestantes. Sabendo que o Mn consegue atravessar a placenta, este metal presente no cordão umbilical pode ser representativo do Mn absorvido pela grávida. Assim, ao analisar a Fig.5.1 do Relatório do Ambiente 2016 (REA, 2016), verificamos que em Portugal o maior contribuidor ao longo dos anos das concentrações médias anuais de NO_2 no ambiente, é o tráfego, estando assim em concordância com os resultados obtidos neste trabalho.



Fonte: APA, CCDR Norte, CCDR Centro, CCDR Lisboa e Vale do Tejo, CCDR Alentejo, CCDR Algarve, DRA Madeira, DRA Açores, 2016

Figura 5.1 - Evolução da concentração média anual de NO_2 por tipologia de estação ($\mu\text{g}/\text{m}^3$) (Imagem adaptada de REA, 2016)

No que diz respeito às concentrações de As destaca-se a população de Lx, que apresenta, na maioria das vezes, os valores médios mais elevados. Na urina, Lx apresenta níveis de As total (As inorgânico e

orgânico) superiores e com diferenças significativas ($p < 0,05$) relativamente às outras populações (Fig. 4.3 e 4.12), com valores médios de 6,46 $\mu\text{g/g}$ creatinina e 5,25 $\mu\text{g/g}$ de creatinina nos grupos A e B, respectivamente. Quanto ao As-S a população de Lx revela novamente os níveis mais elevados (0,16 $\mu\text{g/g}$) e estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) de Vx, no grupo A (Fig. 4.6); porém, no grupo B, a situação é diferente, sendo a população Vx a que tem os valores médios superiores, mas sem significado estatístico ($p > 0,05$) (Fig. 4.15). Como o As é excretado em maiores quantidades na urina, o biomarcador As-U tem uma maior representatividade do que o As-S (ATSDR, 2007b). O VLB definido para o As na urina é $< 30 \text{ ug/L}$ (Rodríguez et al., 2003); como os valores médios encontrados na população de Lx foram de 3,36 ug/L e 1,52 ug/L , respectivamente nos grupos A e B, a exposição ambiental ao As nesta população não é preocupante, embora se destaque das restantes populações.

Sabendo que a exposição diária ao As pode ser através da alimentação, como é o caso do consumo de marisco e pescado (Casarett, 2013) que poderá ser um factor de influência nos resultados obtidos. Uma vez que se verificou os relatórios trimestrais municipais e todos os valores estão em cumprimento com o valor paramétrico de As na água ($< 10 \text{ ug/L}$).

Em relação ao As-S e no que respeita os resultados observados na Fig. 4.15, e comparando com a Fig. 4.6, em que a população Vx é a que tem os níveis médios mais elevados (0,04 ug/g) que Lx (0,03 ug/g), embora não sejam significativos ($p > 0,05$), também pode ser justificado pela diminuição do número de indivíduos em ambas as populações do grupo B.

É, no entanto, necessário ter em consideração que as concentrações observadas para estes três metais, Pb, Mn e As, são influenciadas pela existência nesses ambientes de outros metais e outros poluentes aos quais as populações estão expostas, e que irão interagir com os metais analisados, indo alterar a toxicocinética e toxicodinâmica dos mesmos.

- **Níveis de Porfirinas, Ácido delta-aminolevulínico na urina e actividade da Acetilcolinesterase no sangue**

Vários estudos têm vindo a demonstrar que as porfirinas e outros constituintes da via da biossíntese do heme, assim como a inibição da actividade da AChE, podem ser utilizados como biomarcadores sensíveis para a exposição de metais tóxicos em humanos (Jackson, 2011; Ng et al., 2005). Considerando que a maioria das concentrações dos metais quer na urina quer no sangue estavam abaixo ou próximo dos valores de referência, há interesse em verificar se mesmo assim houve alterações nas concentrações de porfirinas e ALA na urina e da actividade da AChE no sangue.

No gráfico das porfirinas na urina no grupo A (Fig. 4.7) verificou-se que as quatro populações em estudo apresentaram diferenças significativas entre si ($p < 0,05$), destacando-se as populações Vx e Lx, pois são as que têm os valores médios mais elevados (117,26 ug/g de creatinina e 67,68 ug/g de creatinina, respectivamente). Ao analisar os valores dos metais nos fluidos biológicos analisados, verificou-se que a população Vx é a que apresenta, na maioria das vezes, as concentrações mais elevadas, em ambos os grupos A e B (Fig. 4.1, 4.2, 4.4, 4.10, 4.11, 4.13 e 4.15) realçando o caso do Pb-U (Fig. 4.1 e 4.4) e Pb-S (4.10 e 4.13); podemos ainda referir que Lx foi a população que se destacou relativamente aos valores do As (Fig. 4.3, 4.6 e 4.12), sendo superior, na maioria das situações, às restantes populações; isto pode ser uma das possíveis justificações para os valores de porfirinas obtidos, uma vez que se sabe que o Pb e As são conhecidos por afectar as vias da biossíntese do heme em mamíferos levando à alterações dos perfis das porfirinas. Vários estudos já demonstraram que o aumento das concentrações de Pb-B e de As-U induzem um aumento das porfirinas urinárias (Chiba et al., 1996; Higashikawa et al., 2000; Makino et al., 2000; Marchiset-Ferlay et al., 2011).

No estudo de Woods e col. (2009), foi constatado que os níveis médios de porfirinas numa população não ocupacionalmente exposta foram de 35,2 µg/g creatinina; nos resultados obtidos neste estudo verificou-se que apenas as populações de Ax e Sx estão abaixo deste valor. O que poderá estar relacionado com o facto destas duas populações apresentarem os níveis dos metais mais baixos.

Na análise do gráfico dos níveis médios de ALA-U, no grupo A, verificamos que as populações em estudo são todas diferentes estatisticamente ($p < 0,05$), excepto Sx e Vx (Fig. 4.8). Podemos evidenciar a população Lx que apresenta os valores médios mais elevados (1,98 mg/g creatinina), verificando-se o mesmo no grupo B (Fig. 4.17), com níveis médios de 1,90 mg/g creatinina, com diferenças significativas de Vx ($p < 0,059$). As concentrações médias de ALA-U encontradas em populações não ocupacionalmente expostas foi de 1,18 mg/g creatinina (Ogata e Taguchi, 1987), que são próximas aos nossos valores médios mais elevados, podendo isto querer dizer que os nossos valores não são preocupantes. Seria no entanto expectável que a população com maiores concentrações médias de ALA-U fosse Vx, uma vez que foi a população com os valores mais altos de Pb, e numerosos estudos indicam que este metal faz aumentar o ALA no sangue e o ALA-U (Higashikawa et al., 2000; Makino et al., 2000; Prista e Sousa Uva, 2003; Tong et al., 2000). Contudo num estudo preliminar de Makino e col. (2000) que envolveu um grande número de trabalhadores expostos a Pb a baixas concentrações (média de 52 µg/L Pb-S), o valor médio do ALA-U pareceu diminuir com o aumento concomitante do nível de Pb-S no intervalo 10,4 µg/L e 178 µg/L. Porém, os autores ainda não encontraram uma explicação para esta tendência observada a baixos níveis de exposição a Pb (Makino et al., 2000). Noutro trabalho desenvolvido por Higashikawa e col. (2000) foi verificado que no intervalo de concentrações de 220 a 290 µg/L de Pb-S, o ALA-U não aumentava, sugerindo que valores inferiores a 300 µg/L de Pb-S não são observadas perturbações no metabolismo do heme.

No que diz respeito à actividade da AChE no sangue no grupo A (Fig. 4.9) e grupo B (4.18) verificamos que ambos os gráficos têm níveis de actividade muito semelhante e sem diferenças significativas ($p > 0,05$), não permitindo formular muitas hipóteses.

• **Análise Discriminante**

Na Fig. 4.19 está representada a análise discriminante das populações com base em todos os biomarcadores de urina, excepto o Mn (Pb-U, As-U, porfirinas e ALA-U), tendo sido verificada uma percentagem de 89,8% de casos agrupados correctamente (Tabela 4.1). Desta forma podemos constatar, que de acordo com os nossos resultados, o Mn-U tem pouca representatividade enquanto biomarcador de exposição, uma vez que, como já referido anteriormente, a principal via de excreção é através das fezes (Casarett, 2013).

Este conjunto de biomarcadores na urina define bem as populações, como se pode observar através da Fig. 4.19, porém a separação das populações Ax e Sx é a menos evidente, possivelmente porque são as que apresentaram menores níveis médios de metais, e poderão apresentar ambientes mais semelhantes entre si.

Na Fig. 4.20, os biomarcadores de efeito na urina (porfirinas e ALA-U) evidenciam bem as populações, com 88% dos casos agrupados correctamente (Tabela 4.2), voltando a ser menos clara a separação das populações Ax e Sx.

Nesta representação apenas foram utilizados os biomarcadores de efeito na urina, verificando-se assim que a AChE poderá não ser um bom biomarcador para a análise dos efeitos da exposição a metais, tal como já se tinha verificado ao observar os seus níveis no sangue (Fig. 4.9 e 4.18).

Por fim, ao analisar estas duas representações verificamos que, apenas utilizando os dois biomarcadores de efeito na urina, a percentagem de casos agrupados correctamente só desce 1%, o que poderá indicar que são suficientes para futuros estudos da exposição a estes metais, poupando assim recursos financeiros e humanos.

CAPÍTULO 6 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com este trabalho verificou-se que a população pertencente a uma zona urbana industrializada (Vx) apresentou na maioria das vezes os níveis médios de metais na urina e no sangue mais elevados. Esta população teve maior relevância relativamente aos níveis de Pb, possivelmente como resultado da actividade industrial. Por outro lado, a população que está exposta a tráfego automóvel e aéreo intenso (Lx) destacou-se no que concerne os níveis de Mn no sangue possivelmente associado ao excesso de poluição provocada pelo tráfego nessa zona do território português. A população Lx também apresentou os níveis médios superiores para o As total. No entanto, comparando os níveis médios obtidos no nosso estudo com os valores de referência, não se observou níveis superiores aos limites propostos pelas entidades reguladoras.

No caso das porfirinas e do ALA verificou-se que as populações Vx e Lx foram as que apresentaram os valores médios mais elevados, visto que também foram estas que se destacaram relativamente aos valores dos níveis de metais, sendo por isso o resultado expectável. Os níveis das porfirinas destas duas populações foram superiores aos encontrados numa população controlo do estudo de Woods e col. (2009), o que poderá significar que a presença dos metais, embora não esteja acima dos valores estabelecidos, possam já estar a provocar alterações nos perfis das porfirinas. Quanto aos valores do ALA, a população Lx foi a que apresentou os valores mais elevados, estando, contudo, próximo dos valores encontrados na população controlo do estudo de Ogata e Taguchi (1987), podendo assim indicar que não são preocupantes. Quanto ao AChE no sangue não foram verificadas diferenças significativas entre as populações Vx e Lx.

Estas determinações poderão inferir que a exposição ambiental aos referidos metais das populações em estudo, assim como da qualidade do ambiente das zonas frequentadas e áreas de habitação têm influência sobre os indivíduos das populações seleccionadas. De acordo com a análise discriminante por nós efectuada, observou-se que utilizando apenas os biomarcadores de efeito na urina (porfirinas e ALA-U) a percentagem de sucesso no agrupamento das populações foi elevada, podendo isto indicar que para futuros estudos de exposição a estes metais estes dois biomarcadores poderão ser suficientes, economizando-se assim recursos financeiros e humanos.

Por fim, não devemos esquecer que estas populações são apenas uma pequena amostra das áreas urbanas frequentadas, adicionando ainda o facto de que certamente estarão expostas a outros metais, o que poderá influenciar a interpretação dos resultados.

Temos ainda de realçar a importância e variabilidade dos marcadores obtidos em populações chamadas de “controlo”, ou seja, populações não ocupacionalmente expostas, neste caso não expostas a metais. Este tipo de informação é muito relevante em estudos com populações expostas ocupacionalmente a metais, pois a interpretação dos resultados é feita com base na comparação dos marcadores obtidos entre indivíduos expostos e populações controlo. A variabilidade observada nos marcadores das populações controlo torna mais difícil a interpretação dos resultados nestes tipos de estudo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aas P. 1988. The toxic effect of an AChE-inhibitor on the cholinergic nervous system in airway smooth muscle. *Toxicology*. 49:91-97.
- Ademuyiwa O, Ugbaja N, Ojo A, Owoigbe O, Adeokun E. 2005. Reversal of aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) inhibition and reduction of erythrocyte protoporphyrin levels by Vitamin C in occupational lead exposure in Abeokuta, Nigeria. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 20(3): 404-411.
- Ajioka R, Phillips J, Kushner J. 2006. Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*. 1763(7):723-736.
- Amorim L. 2003. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*. 6(2): 158-170.
- Andrade V, Mateus M, Batoréu M, Aschner M, Marreilha dos Santos A. 2013. Urinary delta-ALA: a potencial biomarker of exposure and neurotoxic effect in rats co-treated with a mixture of lead, arsenic and manganese. *Neurotoxicology*. 38:33-41.
- Andrade V, Mateus M, Batoréu M, Aschner M, Marreilha dos Santos A. 2015. Lead, Arsenic, and Manganese Metal Mixture Exposures: Focus on Biomarkers of Effect. *Biological Trace Element Research*. 166(1):13-23.
- Aschner M, Guilarte T R, Schneider J S, Zheng W. 2007. Manganese: Recent advances in understanding its transport and neurotoxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology* 221(2): 131-147.
- ATSDR. 2007a. Toxicological Profile for Lead. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR. 2007b. Toxicological Profile for Arsenic. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- ATSDR. 2012. Toxicological Profile for Manganese. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry.
- Bakulski K, Rozek L, Dolinoy D, Paulson H, Hu H. 2012. Alzheimer's Disease and Environmental Exposure to Lead: The Epidemiologic Evidence and Potential Role of Epigenetics. *Current Alzheimer Research*. 9(5):563-573.
- Banerjee M, Banerjee N, Bhattacharjee P, Mondal D, Lythgoe P, Martínez M, Pan J, Polya D, Giri A. 2013. High arsenic in rice is associated with elevated genotoxic effects in humans. *Scientific Reports*. 3: 2195.
- Barbosa F, Tanus-Santos J, Gerlach R, Parsons P. 2005. A Critical Review of Biomarkers Used for Monitoring Human Exposure to Lead: Advantages, Limitations, and Future Needs. *Environmental Health Perspectives*. 113(12):1669-1674.
- Beaty R, Kerber J. 1993. Concepts, instrumentation and techniques in atomic absorption spectrophotometry. Perkin-Elmer Instruments, Norwalk, CT: 96.
- Beck R, Styblo M, Sethupathy P. 2017. Arsenic Exposure and Type 2 Diabetes: MicroRNAs as Mechanistic Links?. *Current Diabetes Reports*. 17(3): 18.

- Bergdahl I, Schütz A, Gerhardsson L, Jensen A, Skerfving S. 1997. Lead concentrations in human plasma, urine and whole blood. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*. 23(5):359-363.
- Betancourt Ó, Tapia M, Méndez I. 2015. Decline of General Intelligence in Children Exposed to Manganese from Mining Contamination in Puyango River Basin, Southern Ecuador. *EcoHealth*. 12(3):453-460.
- Blais J, Rosen M, Smol J. 2015. Using Natural Archives to Track Sources and Long-Term Trends of Pollution: An Introduction. In Blais, J, Rosen, M and Smol, J, ed., *Environmental Contaminants. Developments in Paleoenvironmental Research*, vol 18. Springer, Dordrecht.
- Boeniger M, Lowry L, Rosenberg J. 1993. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *American Industrial Hygiene Association Journal*. 54 (10):615-627.
- Bolann B, Rahil-Khazen R, Henriksen H, Isrenn R, Ulvik R. 2007. Evaluation of methods for trace-element determination with emphasis on their usability in the clinical routine laboratory. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*. 67(4):353-366.
- Bolté S, Normandin L, Kennedy G, Zayed J. 2004. Human Exposure to Respirable Manganese in Outdoor and Indoor Air in Urban and Rural Areas. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 67(6):459-467.
- Bouchard M, Sauvé S, Barbeau B, Legrand M, Brodeur M, Bouffard T, Limoges E, Bellinger D, Mergler D. 2010. Intellectual Impairment in School-Age Children Exposed to Manganese from Drinking Water. *Environmental Health Perspectives*. 119(1):138-143.
- Bowler R, Beseler C, Gocheva V, Colledge M, Kornblith E, Julian J, Kim Y, Bollweg G, Lobdell D. 2016. Environmental exposure to manganese in air: Associations with tremor and motor function. *Science of The Total Environment*. 541:646-654.
- Bowler R, Gysens S, Diamond E, Booty A, Hartney C, Roels H. 2003. Neuropsychological sequelae of exposure to welding fumes in a group of occupationally exposed men. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 206:517-529.
- Brochin R, Leone S, Phillips D, Shepard N, Zisa D, Angerio A. 2008. The Cellular Effect of Lead Poisoning and Its Clinical Picture. *The Georgetown Undergraduate Journal of Health Sciences*. 5(2).
- Calafat A, Longnecker M, Koch H, Swan S, Hauser R, Goldman L, Lanphear B, Rudel R, Engel S, Teitelbaum S, Whyatt R, Wolff M. 2015. Optimal Exposure Biomarkers for Nonpersistent Chemicals in Environmental Epidemiology. *Environmental Health Perspectives*. 123: 166-168.
- Casarett, D. 2013. *Toxicology The basic science of poisons*. 8ª edição. McGraw-Hill Education, USA.
- Castro A, Cabrita L, Marques A, Contreiras A, Ferreira A, Alfaiate B, Cardiga B, Rola E, Lourenço H, Fernandes H, Móra I, Andrade I, Correia J, Cunha M, Ferreira M, Bernardes M, Soares M, Martins M, Gomes M, Carreira T, Cardoso V, Ferreira C, Ribeiro J, Santos L, Marques R. 2000. Guia RELACRE 13 Validação Métodos Internos De Ensaio Em Química.
- Chapman P. 2007. Determining when contamination is pollution — Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environment International*. 33(4):492-501.

Chen S, Wiseman C, Chakravartty D, Cole D. 2017. Metal Concentrations in Newcomer Women and Environmental Exposures: A Scoping Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14(3): 277.

Chiba M, Shinohara A, Matsushita K, Watanabe H, Inaba Y. 1996. Indices of Lead-Exposure in Blood and Urine of Lead-Exposed Workers and Concentrations of Major and Trace Elements and Activities of SOD, GSH-Px and Catalase in Their Blood. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*. 178(1):49-62.

Chibowska K, Baranowska-Bosiacka I, Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Chlubek D. 2016. Effect of Lead (Pb) on Inflammatory Processes in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*. 17(12): 2140.

Chung J, Kim B, Lee B, Moon J, Sakong J, Jeon M, Park J, Choi B, Kim N, Yu S, Seo J, Ye B, Lim Hong Y. 2016. Urinary arsenic species concentration in residents living near abandoned metal mines in South Korea. *Annals of Occupational and Environmental Medicine*. 28: 67.

Corvalan C, Hales S, McMichael A. 2005. Ecosystems and Human Well-being: Health Synthesis - A Report of the Millennium Ecosystem Assessment. WHO Library Cataloguing-in-Publication Data.

Das S, Upadhaya P, Giri S. 2016. Arsenic and smokeless tobacco induce genotoxicity, sperm abnormality as well as oxidative stress in mice in vivo. *Genes and Environment*. 38: 4.

Devi P, Bajala V, Garg V, Mor S, Ravindra K. 2016. Heavy metal content in various types of candies and their daily dietary intake by children. *Environmental Monitoring and Assessment*. 188(2): 86.

Ellman G L, Courtney K D, Andres V, Featherstone R M. 1961. A New and Rapid Colorimetric Determination of Acetylcholinesterase Activity. *Biochemical Pharmacology*. 7(2): 88-95.

Félix A. 2007. Fichas Toxicológicas. Departamento de Saúde Pública e Planeamento. Administração Regional de Saúde do Centro

Finkelstein M, Jerrett M. 2007. A study of the relationships between Parkinson's disease and markers of traffic-derived and environmental manganese air pollution in two Canadian cities. *Environmental Research*. 104(3):420-432.

Finkelstein Y, Milatovic D, Aschner M. 2007. Modulation of cholinergic systems by manganese. *NeuroToxicology*. 28(5):1003-1014.

Garde A, Hansen A, Kristiansen J, Knudsen L. 2004. Comparison of Uncertainties Related to Standardization of Urine Samples with Volume and Creatinine Concentration. *The Annals of Occupational Hygiene*. 48(2):171-179.

Golasik M, Herman M, Piekoszewski W, Gomółka E, Wodowski G, Walas S. 2014. Trace Determination of Manganese in Urine by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Inductively Coupled Plasma–Mass Spectrometry. *Analytical Letters*. 47(11):1921-1930.

González-Merizalde M, Menezes-Filho J, Cruz-Erazo C, Bermeo-Flores S, Sánchez-Castillo M, Hernández-Bonilla D, Mora A. 2016. Manganese and Mercury Levels in Water, Sediments, and Children Living Near Gold-Mining Areas of the Nangaritza River Basin, Ecuadorian Amazon. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 71(2):171-182.

Goyer R. 1990. Transplacental transport of lead. *Environmental Health Perspectives*. 89:101-105.

- Graziano J, Popovac D, Factor-Litvak P, Shrout P, Kline J, Murphy M, Zhao Y, Mehmeti A, Ahmedi X, Rajovic B, Zvicer Z, Nenezic D, Lolacono N, Stein Z. 1990. Determinants of elevated blood lead during pregnancy in a population surrounding a lead smelter in Kosovo, Yugoslavia. *Environmental Health Perspectives*. 89:95-100.
- Guarneros M, Ortiz-Romo N, Alcaraz-Zubeldia M, Drucker-Colin R, Hudson R. 2013. Nonoccupational Environmental Exposure to Manganese is Linked to Deficits in Peripheral and Central Olfactory Function. *Chemical Senses*. 38(9):783-791.
- Hall M, Chen Y, Ahsan H, Slavkovich V, van Geen A, Parvez F, Graziano J. 2006. Blood arsenic as a biomarker of arsenic exposure: Results from a prospective study. *Toxicology*. 225(2-3):225-233.
- Hanna-Attisha M, LaChance J, Sadler R, Champney Schnepf A. 2016. Elevated Blood Lead Levels in Children Associated With the Flint Drinking Water Crisis: A Spatial Analysis of Risk and Public Health Response. *American Journal of Public Health*. 106(2):283-290.
- Haynes E, Heckel P, Ryan P, Roda S, Leung Y, Sebastian K, Succop P. 2009. Environmental manganese exposure in residents living near a ferromanganese refinery in Southeast Ohio: A pilot study. *NeuroToxicology*. 31(5):468-474.
- Heinemann I, Jahn M, Jahn D. 2008. The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 474(2):238-251.
- Higashikawa K, Furuki K, Takada S, Okamoto S, Ukai H, Yuasa T, Ikeda M. 2000. Blood Lead Level to Induce Significant Increase in Urinary Delta-Aminolevulinic Acid Level among Lead-Exposed Workers. A Statistical Approach. *Industrial Health*. 38(2):181-188.
- Jackson C. 2011. *Encyclopedia of Clinical Neuropsychology - Cholinergic System*. Springer New York:562-564.
- Jaishankar M, Tseten T, Anbalagan N, Beeregowda K. 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*. 7(2): 60-72.
- Jakubowski M. 2011. Low-level environmental lead exposure and intellectual impairment in children — The current concepts of risk assessment. *International Journal of Occupational Medicine and Environmental Health*. 24(1):1-7.
- Jiang Y, Zheng W, Long L, Zhao W, Li X, Mo X, Lu J, Fu X, Li W, Liu S, Long Q, Huang J, Pira E. 2007. Brain magnetic resonance imaging and manganese concentrations in red blood cells of smelting workers: Search for biomarkers of manganese exposure. *NeuroToxicology*. 28(1):126-135.
- Jochem W, Razzaque A, Root E. 2016. Effects of health intervention programs and arsenic exposure on child mortality from acute lower respiratory infections in rural Bangladesh. *International Journal of Health Geographics*. 15(1): 32.
- Johnson R, Wichern D. 2007. *Applied multivariate statistical analysis*. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.: 360-430.
- Kałwa A, Habrat B. 2015. Cognitive dysfunctions caused by excessive exposure to manganese compounds- part two. Cognitive disturbances in intravenous users of ephedrone (methcathinone) with manganese compounds. *Psychiatria Polska*. 49(2):305-314.
- Khairul I, Wang Q, Jiang Y, Wang C, Naranmandura H. 2017. Metabolism, toxicity and anticancer activities of arsenic compounds. *Oncotarget*. 8(14): 23905-23926.

- Liang C, Chien Y, Jang C, Chen Chen J. 2017. Spatial Analysis of Human Health Risk Due to Arsenic Exposure through Drinking Groundwater in Taiwan's Pingtung Plain. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14(1): 1-16.
- Liang G, Zhang L, Ma S, Lv Y, Qin H, Huang X, Qing L, Li Q, Chen K, Xiong F, Ma Y, Nong J, Yang X, Zou Y. 2016. Manganese accumulation in hair and teeth as a biomarker of manganese exposure and neurotoxicity in rats. *Environmental Science and Pollution Research*. 23 (12):12265-12271.
- Liang J, Mao J. 2015. Risk assessment of lead emissions from anthropogenic cycle. *Transactions of Nonferrous Metals Society of China*. 26(1):248-255.
- Lin Y, Hwang Y, Chen P, Chen B, Wen H, Liu J, Guo Y. 2012. Contribution of gestational exposure to ambient traffic air pollutants to fetal cord blood manganese. *Environmental Research*. 112:1-7.
- Lucas R. 2010. In vivo assays to study the interference of chemoprotectors on manganese neurotoxicity. Tese de Mestrado em Biologia Humana e Ambiente. Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa.
- Makino S, Tsuruta H, Takata T. 2000. Relationship Between Blood Lead Level and Urinary ALA Level in Workers Exposed to Very Low Levels of Lead. *Industrial Health*. 38(1):95-98.
- Marchetti C. 2003. Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. *Neurotoxicity Research*. 5(3):221-235.
- Marchiset-Ferlay N, Savanovitch C, Sauvant-Rochat M. 2011. What is the best biomarker to assess arsenic exposure via drinking water?. *Environment International*. 39(1):150-171.
- Mason L, Harp J, Han D. 2014. Pb Neurotoxicity: Neuropsychological Effects of Lead Toxicity. *BioMed Research International*. 2014(840547):1-8.
- Miller R, Brindle E, Holman D, Shofer J, Klein N, Soules MO'Connor K. 2004. Comparison of Specific Gravity and Creatinine for Normalizing Urinary Reproductive Hormone Concentrations. *Clinical Chemistry*. 50(5):924-932.
- Mishra S, Alfeld M, Sobotka R, Andresen E, Falkenberg GKüpper H. 2016. Analysis of sublethal arsenic toxicity to *Ceratophyllum demersum*: subcellular distribution of arsenic and inhibition of chlorophyll biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*. 67(15):4639-4646.
- Moreira F, Moreira J. 2004. Os efeitos do chumbo sobre o organismo humano e seu significado para a saúde. *Revista Panamericana de Salud Pública*. 15(2):119-129.
- Nascimento S, Baierle M, Göethel G, Barth A, Brucker N, Charão M, Sauer E, Gauer B, Arbo M, Altknecht L, Jager M, Dias A, de Salles J, Pierre T, Gioda A, Moresco RGarcia S. 2016. Associations among environmental exposure to manganese, neuropsychological performance, oxidative damage and kidney biomarkers in children. *Environmental Research*. 147:32-43.
- Nash D, Magder L, Lustberg M, Sherwin R, Rubin R, Kaufmann R Silbergeld E. 2003. Blood Lead, Blood Pressure, and Hypertension in Perimenopausal and Postmenopausal Women. *JAMA*. 289 (12): 1523-1532.
- Nava-Ruiz C, Méndez-Armenta M, Ríos C. 2012. Lead neurotoxicity: effects on brain nitric oxide synthase. *Journal of Molecular Histology*. 43(5):553-563.

- Neal A, Guilarte T. 2013. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. *Toxicology Research*. 2(2):99-114.
- Neamtii I, Bloom M, Dumitrascu I, Roba C, Pop C, Ordeanu C, Balacescu O, Gurzau E. 2016. Impact of exposure to tobacco smoke, arsenic, and phthalates on locally advanced cervical cancer treatment—preliminary results. *PeerJ*. 4: e2448.
- Needleman H, Schell A, Bellinger D, Leviton A, Allred E. 1990. The Long-Term Effects of Exposure to Low Doses of Lead in Childhood. *New England Journal of Medicine*. 322:83-88.
- Ng J, Wang J, Zheng B, Zhai C, Maddalena R, Liu F, Moore M. 2005. Urinary porphyrins as biomarkers for arsenic exposure among susceptible populations in Guizhou province, China. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 206(2):176-184.
- NRC (National Research Council). 1999. *Arsenic in Drinking Water - Biomarkers of Arsenic Exposure*. National Academies Press (US), Washington (DC).
- O'Bryant S, Edwards M, Menon C, Gong G, Barber R. 2011. Long-Term Low-Level Arsenic Exposure Is Associated with Poorer Neuropsychological Functioning: A Project FRONTIER Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 8(3):861-874.
- O'Neal S, Zheng W. 2015. Manganese Toxicity Upon Overexposure: a Decade in Review. *Current Environmental Health Reports*. 2(3):315-328.
- Ogata M, Taguchi T. 1987. High performance liquid chromatographic procedure for quantitative determination of urinary delta-aminolevulinic acid as indices of lead exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health*. 59: 385-391.
- Payton M, Riggs K, Spiro A, Weiss S, Hu H. 1998. Relations of Bone and Blood Lead to Cognitive Function: The VA Normative Aging Study. *Neurotoxicology and Teratology*. 20(1):19-27.
- Pirkle J, Brody D, Gunter E, Kramer R, Paschal D, Flegal K, Matte D. 1994. The Decline in Blood Lead Levels in the United States. *JAMA*. 272(4):284-291.
- Pocock S, Smith M, Baghurst P. 1994. Environmental lead and children's intelligence: a systematic review of the epidemiological evidence. *BMJ*. 309 (6963):1189-1197.
- Prista J, Sousa Uva A. 2003. Vigilância biológica de trabalhadores expostos a chumbo: Comparação de alguns indicadores de efeito. *Sociedade Portuguesa Medicina do Trabalho*. 5:37-58.
- Racette B, Aschner M, Guilarte T, Dydak U, Criswell S, Zheng W. 2012. Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicity. *NeuroToxicology*. 33(4):881-886.
- Racette B, Aschner M, Guilarte T, Dydak U, Criswell S, Zheng W. 2012. Pathophysiology of manganese-associated neurotoxicity. *NeuroToxicology*. 33(4):881-886.
- Racette B. 2014. Manganism in the 21st century: The Hanninen lecture. *NeuroToxicology*. 45:201-207.
- REA - Relatório do Estado do Ambiente Portugal. 2016. Agência Portuguesa do Ambiente.
- Rebelo F, Caldas E. 2016. Arsenic, lead, mercury and cadmium: Toxicity, levels in breast milk and the risks for breastfed infants. *Environmental Research*. 151:671-688.

- Reddy G, Basha M, Devi C, Suresh A, Baker J, Shafeek A, Heinz J, Chetty C. 2003. Lead induced effects on acetylcholinesterase activity in cerebellum and hippocampus of developing rat. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 21(6):347-352.
- Ribeiro M. 2013. Contaminação do Solo por Metais Pesados. Tese de Mestrado em Engenharia do Ambiente. Faculdade de Engenharia, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias.
- Rocha A. 2008. Cádmio, Chumbo, Mercúrio - A problemática destes metais pesados na Saúde Pública?. Monografia. Faculdade de Ciências da Nutrição e Alimentação, Universidade do Porto
- Rocha G, Steinbach C, Munhoz J, Madia M, Faria J, Hoeltgebaum D, Barbosa F, Batista B, Souza V, Nerilo S, Bando E, Mossini S, Nishiyama P. 2016. Trace metal levels in serum and urine of a population in southern Brazil. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 35:61-65.
- Rodríguez V, Jiménez-Capdeville M, Giordano M. 2003. The effects of arsenic exposure on the nervous system. *Toxicology Letters*. 145(1):1-18.
- Rodríguez-Agudelo Y, Riojas-Rodríguez H, Ríos C, Rosas I, Sabido Pedraza E, Miranda J, Siebe C, Texcalac J, Santos-Burgoa C. 2006. Motor alterations associated with exposure to manganese in the environment in Mexico. *Science of The Total Environment*. 368(2-3):542-556.
- Rothenberg S, Karchmer S, Schnaas L, Perroni E, Zea F, Alba J. 1994. Changes in Serial Blood Lead Levels during Pregnancy. *Environmental Health Perspectives*. 102(10):876-880.
- Sadão M. 2002. Intoxicação por chumbo. *Revista de Oxidologia*. jan - fev - mar:37-42.
- Sakai T. 2000. Biomarkers of Lead Exposure. *Industrial Health*. 38(2):127-142.
- Sanders T, Liu Y, Buchner V, Tchounwou P. 2009. Neurotoxic Effects and Biomarkers of Lead Exposure: A Review. *Reviews on Environmental Health*. 24:15(1)-45.
- Santamaria A and Sulsky S. 2010. Risk Assessment of an Essential Element: Manganese. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. 73(2):128-155.
- Santamaria A. 2008. Manganese exposure, essentiality & toxicity. *Indian Journal of Medical Research*. 128(4):484-500.
- Santos D, Batoreu C, Mateus L, Marreilha dos Santos Aschner M. 2014. Manganese in human parenteral nutrition: Considerations for toxicity and biomonitoring. *NeuroToxicology*. 43:36-45.
- Santos D, Milatovic D, Andrade V, Batoreu M, Aschner M, Marreilha dos Santos A. 2012. The inhibitory effect of manganese on acetylcholinesterase activity enhances oxidative stress and neuroinflammation in the rat brain. *Toxicology*. 292(2-3):90-98.
- Silva A. 2014. Avaliação morfológica e elemental num modelo experimental de intoxicação com metais pesados. Tese de Mestrado em Química Forense. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra.
- Skoog D A, West D M, Holler F J, Crouch S R. 2014. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9ª edição. Brooks/Cole, Cengage Learning, Belmont, USA.
- Soldin O, Aschner M. 2007. Effects of manganese on thyroid hormone homeostasis: Potential links. *NeuroToxicology*. 28(5):951-956.

- Soulsby J, Smith R. 1974. A simplified method for the quantitative determination of urinary coproporphyrin in lead workers. *Occupational and Environmental Medicine*. 31(1):72-74.
- Souza J, Carneiro M, Paulelli A, Grotto D, Magalhães Júnior A, Barbosa Júnior F, Batista B. 2014. Arsenic and Rice: Toxicity, Metabolism, and Food Safety. *Química Nova*. 38(1):118-127.
- Sun G, Li Z, Liu T, Chen J, Wu T, Feng X. 2017. Metal Exposure and Associated Health Risk to Human Beings by Street Dust in a Heavily Industrialized City of Hunan Province, Central China. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 14(3): 261-272.
- Tchounwou P, Yedjou C, Patlolla A, Sutton D. 2012. Heavy Metal Toxicity and the Environment. *Experientia Supplementum*. 101: 133-164.
- Tolins M, Ruchirawat M, Landrigan P. 2014. The Developmental Neurotoxicity of Arsenic: Cognitive and Behavioral Consequences of Early Life Exposure. *Annals of Global Health*. 80(4):303-314.
- Tomokuni K, Ogata M. 1972. Simple Method for Determination of Urinary delta-Aminolevulinic Acid as an Index of Lead Exposure. *Clinical Chemistry*. 18(12):1534-1538.
- Tong S, Schirnding Y, Prapamontol T. 2000. Environmental lead exposure: a public health problem of global dimensions. *Bulletin of the World Health Organization*. 78(9): 1068-1077.
- Tyler C, Allan A. 2014. The Effects of Arsenic Exposure on Neurological and Cognitive Dysfunction in Human and Rodent Studies: A Review. *Current Environmental Health Reports*. 1(2):132-147.
- Uluozlu O, Tuzen M, Mendil D, Soylak M. 2008. Assessment of trace element contents of chicken products from turkey. *Journal of Hazardous Materials*. 163(2-3):982-987.
- UNEP. 2016. Healthy Environment, Healthy People - Thematic report.
- Vahidnia A, van der Voet Gde Wolff F. 2007. Arsenic neurotoxicity — A review. *Human & Experimental Toxicology*. 26(10):823-832.
- von Ehrenstein O, Poddar S, Yuan Y, Mazumder D, Eskenazi B, Basu A, Hira-Smith M, Ghosh N, Lahiri S, Haque R, Ghosh A, Kalman D, Das Smith A. 2007. Children's Intellectual Function in Relation to Arsenic Exposure. *Epidemiology*. 18(1):44-51.
- Wang S, Wang Z, Cheng X, Li J, Sang Z, Zhang X, Han L, Qiao X, Wu Z, Wang Z. 2007. Arsenic and Fluoride Exposure in Drinking Water: Children's IQ and Growth in Shanyin County, Shanxi Province, China. *Environmental Health Perspectives*. 115(4):643-647.
- WHO. 2001. International Programme on Chemical Safety. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation.
- WHO. 2006. Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals. *Environmental Health Criteria* 237.
- WHO. 2010. Exposure to lead: A major public health concern. *Public health and Environment World Health Organization*.
- Wong C, Li X, Thornton I. 2006. Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environmental Pollution*. 142(1):1-16.

Woods J S, Martin M D, Leroux B G, DeRouen T A, Bernardo M F, Luis H S, Leitão J G, Simmonds P L, Rue T C. 2009. Urinary porphyrin excretion in normal children and adolescents. *Clinica Chimica Acta*. 405(1-2): 104-109.

Yoon M, Schroeter J, Nong A, Taylor M, Dorman D, Andersen MClewell H. 2011. Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling of Fetal and Neonatal Manganese Exposure in Humans: Describing Manganese Homeostasis during Development. *Toxicological Sciences*. 122(2):297-316.

Zeng X, Xu X, Boezen H M, Huo X. 2016. Children with health impairments by heavy metals in an e-waste recycling area. *Chemosphere*. 148:408-415.

Zheng W, Fu S X, Dydak U, Cowan D M. 2010. Biomarkers of manganese intoxication. *NeuroToxicology*. 32(1): 1-8.